



N° d'ordre: 2586

THESE

Présentée pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

École doctorale : SEVAB

Spécialité : Développement des Plantes.

Par Mlle Marie HOMMEL

Titre de la thèse

La régulation transcriptionnelle de l'expression génique dans le fruit de tomate : caractérisation fonctionnelle de promoteurs fruit-spécifiques et d'un co-facteur de la transcription de type MBF1.

Soutenue le 20 Décembre 2007 devant le jury composé de :

Mr	Mondher BOUZAYEN	Président
Mr	Jean-Claude PECH	Directeur de thèse
Mr	Farid REGAD	Co-Directeur de thèse
Mr	Angel MATILLA	Rapporteur
Mme	Françoise CORBINEAU	Rapporteur
Mr	Christophe ROTHAN	Rapporteur

Je remercie sincèrement toutes les personnes qui ont, de près ou de loin, pris part à ce travail et avec qui j'ai partagé des moments de science et de convivialité pendant ces 5 années.

Un grand merci

à mes encadrants qui m'ont accueilli et m'ont fait confiance

Mondher, Jean-Claude, Alain

à *Farid* qui m'a fait partager sa science et m'a, malgré tout, accompagnée et encouragée jusqu'au bout.

à *Simone* pour son importante participation à ce travail, sa bienveillance, sa bonne humeur et tous ces moments partagés.

à *Isabelle* pour sa disponibilité, son travail efficace et inspiré et bien plus...

à l'indispensable équipe transfo qui a fourni un travail fastidieux et consciencieux

Hélène, Dominique, Lydie, Olivier et Carole.

aux spécialistes de la microscopie pour leur aide et leur disponibilité

Alain, Cécile.

aux stagiaires qui ont pris part à l'aventure

Florence, Gilles, Emilie, Ouissal.

à tous les membres du labo GBF pour votre aide et vos conseils

Corinne, Julien, Sophie, Paloma, Salma, Christina, Simo, Benoit, Brigitte, Pierre, Murielle, Hua, Christian, Anne, Nadine...

Merci à tous pour votre bonne humeur, le soutien et l'amitié que vous m'avez témoigné, merci pour tous ces bons moments....

Merci à mes proches qui m'ont soutenue et supportée pendant ces années.

Mes parents, Romain....

A tous, ce travail vous est dédié

Résumé

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'intéressent à la régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes au cours du développement du fruit de tomate à travers l'étude des *cis*-régulations et des *trans*-régulations. Dans un premier temps, une tentative de caractérisation de promoteur dirigeant l'expression génique spécifiquement dans le fruit a été menée. Pour cela, nous nous sommes focalisés sur l'étude de régions promotrices d'un gène codant une expansine et d'un autre codant une alcool acyl transférase. Ces études ont été menées en évaluant la capacité de ces régions promotrices à diriger l'expression du gène rapporteur codant pour la β -glucuronidase dans des plants de tomate et d'*Arabidopsis*. Néanmoins, ces approches fonctionnelles n'ont pas permis de dégager un motif consensus capable à lui seul de conférer une expression fruit-spécifique. C'est pourquoi, les travaux de thèse se sont orientés vers la caractérisation d'un co-activateur de transcription de type MBF1 (Multiprotein Bridging Factor1), *S*IER24 de tomate. Nous avons montré qu'une fusion de *S*IER24 à un motif répresseur EAR (Ethylene-responsive element-binding associated Amphiphilic Repression) est capable, dans un système cellulaire, de réduire l'expression du gène rapporteur GFP dirigée par un promoteur synthétique de réponse à l'éthylène. Cette validation fonctionnelle par une méthode transitoire, nous a conduit à surexprimer cette construction, de façon stable, dans la tomate MicroTom. Cette surexpression de la construction chimérique *S*IER24-EAR, induit un retard de germination mais n'a pas d'effet notable sur le développement de la plante. Une fusion similaire de son orthologue *AtMBF1c* au motif EAR entraîne chez *Arabidopsis thaliana* une réduction du pourcentage de germination et un nanisme de la plante. Au-delà de l'information sur le rôle des gènes *MBF1* dans le développement des plantes, cette étude démontre que la stratégie utilisant le domaine répresseur EAR n'est pas seulement efficace pour l'étude des facteurs de transcription comme cela a été démontré jusque là, mais également pour les co-activateurs ne se liant pas directement à l'ADN.

Abstract

The work presented in this manuscript is focused on the study in tomato fruit of gene expression regulation at the transcriptional level and comprises two parts. The first part concerns the isolation and characterization of promoters capable of specifically driving gene expression in tomato fruit. For this purpose, the capacity of native promoter regions and various deletions from two tomato genes, one encoding an expansin and a second encoding an alcohol acyl transferase to drive the expression of the GUS reporter gene, has been studied after stable transformation. This approach does not allow us to define a consensus motif able to drive the activity of a minimal specifically to the fruit. This is why the second part of the thesis was redirected to the characterization of a transcriptional co-activator of the MBF1 family, *SIER24*, in tomato. It is shown here that a chimerical fusion of *SIER24* with the EAR (Ethylene-responsive element-binding associated Amphiphilic Repression) motif is capable of reducing the expression of the GFP reporter gene, driven by a synthetic ethylene-responsive promoter, in a transient cell system. This functional validation led us to express stably the construct in tomato plant using MicroTom for practical reasons. The overexpression of the *SIER24*/EAR motif fusion caused a germination delay but it had no significant effect on the tomato plant growth. A similar fusion using *AtMBF1c* from *Arabidopsis*, caused a reduction in the percentage of seed germination and dwarfism of the plant. Considering the role of the *MBF1* genes in plant development, this study demonstrates that the EAR strategy is efficient not only for transcription factors, as demonstrated so far, but also in the case of co-activators known to not bind directly to DNA.

Sommaire

Introduction au sujet de thèse	1
Contexte scientifique	1
La régulation fruit- et maturation- spécifique de l'expression des gènes.	2
SlER24, un co-activateur de type MBF1 régulé pendant la maturation du fruit.....	2
Objectifs des travaux	3
Chapitre I	5
Revue Bibliographique.....	5
1- La maturation des fruits, processus régulé par l'éthylène et son modèle d'étude : la tomate	7
1-1 Le modèle d'étude et ses approches méthodologiques.....	7
1-2 La maturation des fruits charnus.....	10
1-3 L'éthylène : l'hormone clé de la maturation du fruit	12
2- La régulation transcriptionnelle chez les eucaryotes	16
2-1 Définition générale	17
2-2 Le promoteur	18
2-3 Les acteurs protéiques de la transcription	19
Chapitre II	27
Isolement et caractérisation de promoteurs fruit-spécifiques chez la tomate	27
1-Introduction.....	29
1-1 Méthodes d'identification de gènes à partir de leur profil d'expression	33
1-2 Promoteur fruits-spécifiques connus et leur utilisation pour diriger l'expression de gènes d'intérêt.....	37
1-3 L'expansine1 de tomate	42
1-4 L' alcool acyl-transférase1 de tomate.....	43
2-Matériel et méthodes.....	45
2-1 Matériel végétal	45
2-2 Analyses de l'expression des gènes par RT-PCR.....	45
2-3 Isolement de séquences promotrices	47
2-4 Analyses des séquences promotrices	49
2-5 transformation génétique des plantes.....	50
2-6 Analyses des lignées transgéniques	52
2-7 Analyses d'interactions AND/protéine par gel retard.....	53
3-Résultats et discussion.....	55
3-1 Etude fonctionnelle du promoteur de l'expansine 1 de tomate.....	55
3-2 Etude fonctionnelle du promoteur d'une alcool acyl-transférase de tomate AAT.....	65
4-Conclusion.....	71
Chapitre III	73
Caractérisation d' ER24 un co-facteur de transcription de type MBF1 répondant à l'éthylène chez la tomate	73
1-Introduction.....	75
1-1 La famille des co-facteurs de transcription de type MBF1 chez la levure et les animaux	77
1-2 La famille des co-facteurs de transcription de type MBF1 chez les plantes supérieures	79
2- Characterization of tomato Sl-MBF1 transcriptional co-activator gene family.....	83
2-1 Introduction.....	83

2-2 Acte de congrès	85
2-3 Conclusion.....	92
3- Over-expression of a chimeric gene of the transcriptional co-activator MBF1 fused to the EAR repressor motif causes developmental alteration in Arabidopsis and tomato.	93
3-1 Introduction.....	93
3-2 Article.....	95
4 Résultats complémentaires	105
4-1 localisation subcellulaire de <i>SIER24</i> par transformation transitoire	105
4-2 tentative de diminution de l'expression de <i>SIER24</i> par une approche VIGS	108
5-Conclusion.....	113
Conclusion générale et Perspectives des travaux de thèse	115
Références bibliographiques	1211

Publications réalisées au cours de la thèse

Article:

M. Hommel, Q. Khalil-Ahmad, F Jaimes-Miranda, I. Mila, C. Pouzet, A. Latché, J.C. Pech, M. Bouzayen and F. Regad

Over-expression of a chimeric gene of the transcriptional co-activator MBF1 fused to the EAR repressor motif causes developmental alteration in *Arabidopsis* and tomato.

Plant Science (article accepté)

Acte de congrès :

Sanchez-Ballesta M.T., **Hommel M.**, Jaimes-Miranda F., Tournier B., Zegzouti H., Mila I., Latche A., Pech J.C., Bouzayen M. and Regad F.

Characterization of tomato *Sl-MBF1* transcriptional co-activators gene family.

A. Ramina et al. (eds.), Advances in Plant Ethylene Research: Proceedings of the 7th International Symposium on the Plant Hormone Ethylene, 369-375, 2007 Springer.

Poster:

Hommel M., Jaimes-Miranda F., Mila I., Ducasse E., Latche A., Pech J.C., Bouzayen M. and Regad F.

Overexpression of the chimeric gene of the transcriptional co-activator MBF1 fused to the EAR repressor motif causes seed germination delay in *Arabidopsis* and Tomato.

4th Solanaceae Genome Workshop 2007, Sept 9-13, 2007, Ramada Hotel, Jeju Island, Korea

Abréviations

ABA	Acide Abscissique
ABRE	ABA Response Element (Elément de réponse à l'ABA)
ACC	1-aminocyclopropane-1-acide carboxylique
ACO	ACC Oxydase
ACS	ACC Synthase
ARF	Auxin Response Factor
ATP	Adénosine triphosphate
AuxRE	Auxin Response Element
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
CRES-T	Chimeric Repressor Silencing-Technology
EAR	ERF-associated Amphiphilic Repression
ER24	Ethylene Responsive 24
ERE	Ethylene Response Element (Elément de réponse à l'éthylène)
ERF	Ethylene Responsive Factor (Facteur de réponse à l'éthylène)
EXP	Expansine
EST	Expressed Sequence Tag
GA	Gibbérellines
GFP	Green Fluorescent Protein
GUS	béta-glucuronidase
HTH	Hélice-Tour-Hélice
JAA	Jour Après Anthèse
MBF1	Multiprotein Bridging Factor1
MCP	1-Methylcyclopropène
PCR	Polymerase Chain Reaction
PG	Polygalacturonase
PTGS	Post-Transcriptional Gene Silencing
QTL	Quantitative Trait Loci
RFP	Red Fluorescent Protein
TAF	TBP Associated Factors (Facteurs associés à la TBP)
TBP	TATA Binding Protein
TF	Transcription Factor
VIGS	Virus-Induced Gene Silencing
X-Gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide

Introduction au sujet de thèse

Contexte scientifique et objectifs des travaux

Cette thèse a pour objectif de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'expression des gènes dans le fruit de tomate (*Solanum lycopersicum*) et plus particulièrement pendant le processus de maturation. Cette problématique a été entreprise initialement à travers l'isolement et la caractérisation de promoteurs préférentiellement exprimés dans le fruit, puis, à travers une étude fonctionnelle d'un co-activateur de la transcription régulé par l'éthylène appartenant à la famille des MBF1 (Multiprotein Bridging Factor1) chez la tomate.

Contexte scientifique

La maturation des fruits constitue une phase de développement génétiquement programmée et modulable par des facteurs extérieurs. Ce processus complexe met en œuvre, de façon coordonnée, l'expression de gènes spécifiques impliqués dans diverses voies métaboliques conduisant à des bouleversements tant biochimiques que physiologiques et structuraux. Ainsi, la régulation de l'expression génique au cours du processus de maturation se traduit notamment par un changement de couleur, une augmentation de la teneur en sucres, une synthèse d'aromes et un ramollissement des tissus

Les fruits sont classés en deux catégories, climactériques et non-climactériques, selon qu'ils, respectivement, présentent ou non un pic de respiration et de synthèse d'éthylène au moment de l'entrée en maturation (Biale, 1964). La tomate, espèce modèle du laboratoire d'accueil, appartient à la catégorie des fruits dits climactériques. L'augmentation brutale de la synthèse d'éthylène lors de la maturation des fruits climactériques est, en grande partie, responsable de l'initiation de l'ensemble des modifications biochimiques subies par le fruit et donc de l'expression de gènes impliqués dans ces modifications. L'éthylène régule l'expression des gènes *via* une chaîne de perception et de transduction du signal qui est maintenant bien connue (Wang *et al.* 2002). Cette chaîne aboutit à la modulation de l'expression génique *via* l'interaction de facteurs *trans*-activateurs impliqués dans des

complexes de transcription avec des régions promotrices *cis*-régulatrices. Ces mécanismes permettent une amplification, une diversification et une sélectivité de la réponse hormonale. Parmi les différents niveaux de régulation mis en jeu au cours de ces processus, la régulation de l'activité transcriptionnelle des gènes constitue un point stratégique où peuvent s'opérer des dialogues entre plusieurs voies de signalisation.

La régulation fruit- et maturation- spécifique de l'expression des gènes.

Les études d'expression génique ont montré que de nombreux gènes s'expriment spécifiquement dans le fruit et certains même plus précisément ou plus fortement au cours de la maturation. Cependant les mécanismes responsables de cette spécificité d'expression sont peu connus malgré la multiplicité des processus qu'ils régulent.

Les régions promotrices des gènes constituent un lieu privilégié au niveau duquel s'exerce la régulation spatio-temporelle de l'expression. Un certain nombre de promoteurs conférant une expression fruit ou maturation spécifique ont été identifiés à partir de données d'expression. Ainsi certains de ces promoteurs ont été isolés et utilisés pour diriger l'expression de gènes dans des approches biotechnologiques. Il s'agit notamment, chez la tomate, du promoteur 2A11 (Van Haaren et Houck, 1991), du promoteur de l'ACO1 (Blume *et al.*, 1997 ; Blume et Grierson, 1997), du promoteur E8 (Deikman *et al.*, 1992), du promoteur E4 (Montgomery *et al.*, 1993) et du promoteur de la polygalacturonase (Nicholass *et al.*, 1995) et, chez le melon, du promoteur du gène codant la cucumisine (Yamagata *et al.*, 2002). Cependant, des éléments *cis*-régulateurs clairement impliqués dans cette spécificité d'expression chez la tomate n'ont pas été, jusqu'à présent, définis. En revanche, un élément *cis*-activateur impliqué dans la régulation spatiale de l'expression a été identifié chez le melon, dans le promoteur du gène codant la cucumisine (Yamagata *et al.*, 2002).

S~~IER~~24, un co-activateur de type MBF1 régulé pendant la maturation du fruit

Le gène *S~~IER~~24* a été le premier régulateur transcriptionnel de type MBF1 (Multiprotein Bridging Factor 1) identifié dans le règne végétal. Il a été isolé au laboratoire en tant que gène de réponse précoce à l'éthylène (Zegzouti *et al.* 1999). Les gènes *MBF1* codent pour des co-activateurs de la transcription et constituent une des composantes du complexe transcriptionnel TAF (TBP Associated Factors) qui associe d'une part la TBP (TATA-Box Binding Protein) à des facteurs généraux de la transcription pour moduler l'activité transcriptionnelle de gènes cibles. Ainsi, ces protéines peuvent constituer un lieu d'intégration

de voies de signalisation et permettre un niveau de régulation complexe de l'expression génique en interagissant spécifiquement avec des facteurs de transcription de manière tissu-spécifique. Sur la base de son expression différentielle dans le fruit et en réponse à l'éthylène et de son implication potentielle dans des complexes régulateurs de la transcription, l'hypothèse d'un rôle spécifique pour *SIER24* dans la régulation génique en réponse à cette hormone et au cours de la maturation peut être avancée.

Objectifs des travaux

Etant donné l'importance de la régulation transcriptionnelle dans la mise en place du programme génétique spécifique au développement et à la maturation des fruits, mon projet de thèse s'insère dans ce contexte thématique et concerne plus précisément deux éléments centraux impliqués dans ce type de régulation. En effet, mon travail de thèse s'est focalisé tout d'abord, sur l'étude des régions promotrices de deux gènes s'exprimant spécifiquement dans le fruit, puis sur l'étude d'un co-activateur transcriptionnel de type MBF1 (Multiprotein Bridging Factor 1). Ainsi, les approches mises en œuvre ont pour objectif d'apporter de nouveaux éléments qui permettraient d'avancer dans la compréhension des mécanismes génétiques qui contrôlent l'expression spatio-temporelle des gènes dans le fruit. Ces mécanismes sont jusqu'à présent peu connus du fait de la multiplicité des phénomènes mis en jeux.

Pour développer ces approches fonctionnelles, deux modèles végétaux ont été utilisés. La tomate, fruit climactérique et modèle universel pour l'étude des fruits charnus. Une autre plante modèle, l'arabette (*Arabidopsis thaliana*) a été utilisée comme outil pour la validation fonctionnelle des constructions et l'étude d'un gène orthologue.

Plan du manuscrit

La revue bibliographique présentée dans le chapitre I est consacrée d'une part, au processus de maturation des fruits charnus et à la présentation de la tomate comme espèce modèle pour étudier ce processus et d'autre part, aux mécanismes généraux de la transcription chez les eucaryotes. Après ce chapitre d'introduction générale, ce manuscrit de thèse comportera un chapitre concernant l'isolement et la caractérisation de promoteurs de gènes fruit-spécifiques, l'un codant une expansine et l'autre une alcool acyl transférase. Enfin, suivra un chapitre décrivant la caractérisation de *SIER24*, un co-facteur de transcription de type MBF1 répondant à l'éthylène chez la tomate. Ce dernier chapitre inclut le manuscrit d'un

acte de congrès présentant l'isolement et la caractérisation de la famille multigénique des MBF1 chez la tomate et un article accepté dans la revue « Plante Science » consacré à la description des phénotypes obtenus par fusion du domaine répresseur de la transcription EAR aux protéines de type MBF1.

Chapitre I

Revue Bibliographique

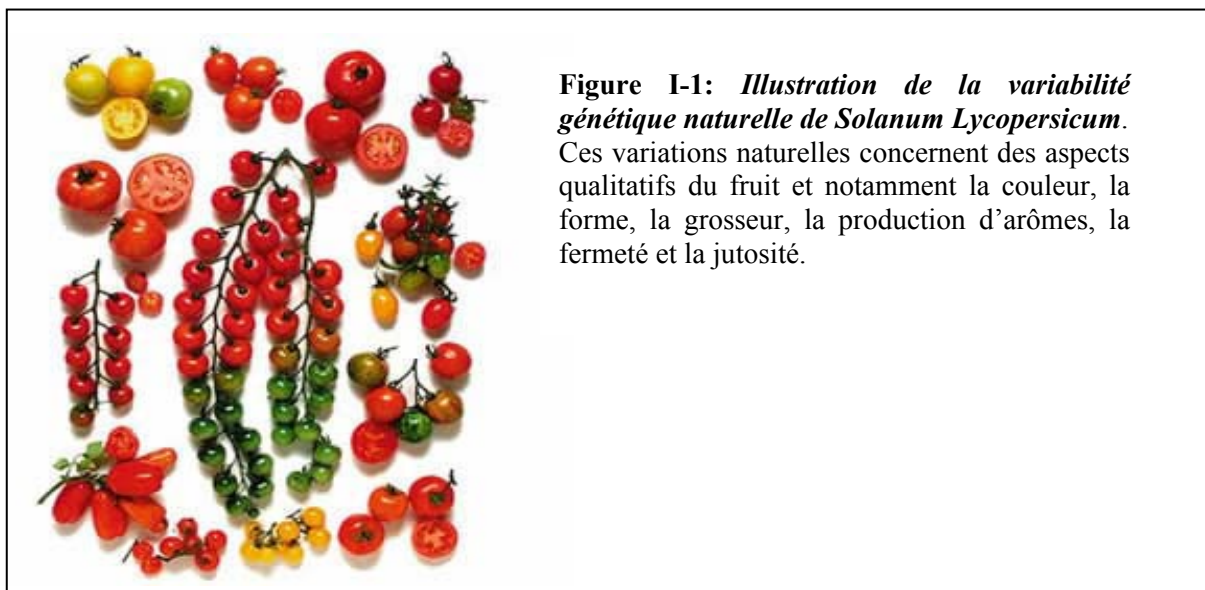
Le processus de maturation des fruits charnus
et son modèle d'étude : la tomate

La régulation transcriptionnelle chez les
eucaryotes

1- La maturation des fruits, processus régulé par l'éthylène et son modèle d'étude : la tomate

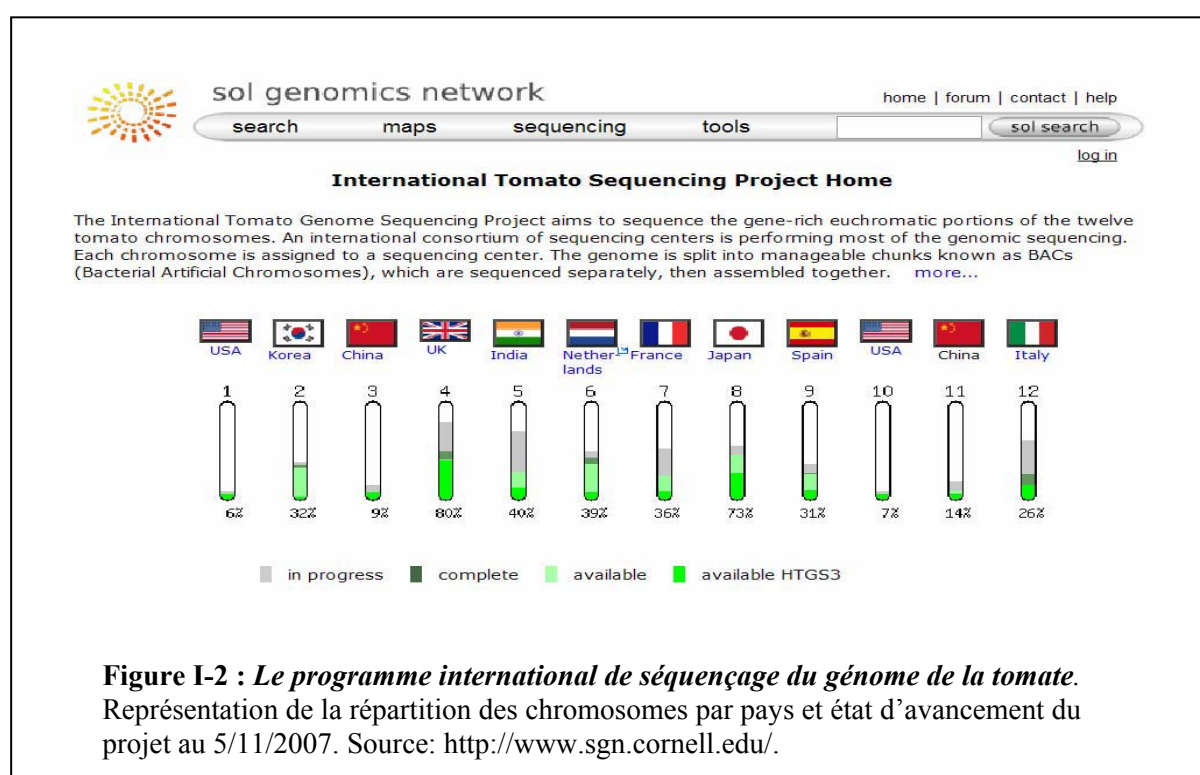
1-1 Le modèle d'étude et ses approches méthodologiques

La tomate (*Solanum lycopersicum*) appartient à la famille des solanacées tout comme la pomme de terre, le poivron et l'aubergine. Cette famille présente un intérêt économique majeur car elle est, après les céréales, la seconde production agricole à destination alimentaire. Les ressources génétiques naturelles de la tomate (plusieurs centaines de variétés) ont été abondamment exploitées pour l'amélioration variétale en particulier pour l'amélioration de ses qualités organoleptiques comme l'illustre la figure I-1 et sa résistance aux pathogènes. La tomate est considérée par l'ensemble de la communauté scientifique comme la plante modèle pour l'étude des fruits charnus. La grande majorité des données concernant les mécanismes moléculaires de la maturation des fruits climactériques ont été obtenues chez ce fruit (Giovannoni, 2001; revue) puis ont été ensuite transposées à d'autres espèces. Chez les fruits non-climactériques où les signaux contrôlant le processus de maturation sont moins connus, il n'existe pas de fruit modèle unanimement reconnu. Cependant, la fraise, le raisin et l'orange sont sans doute ceux qui sont le plus étudiés. Parmi ceux-ci, le raisin possède l'avantage d'avoir son génome actuellement en cours de séquençage (Jaillon *et al.*, 2007).



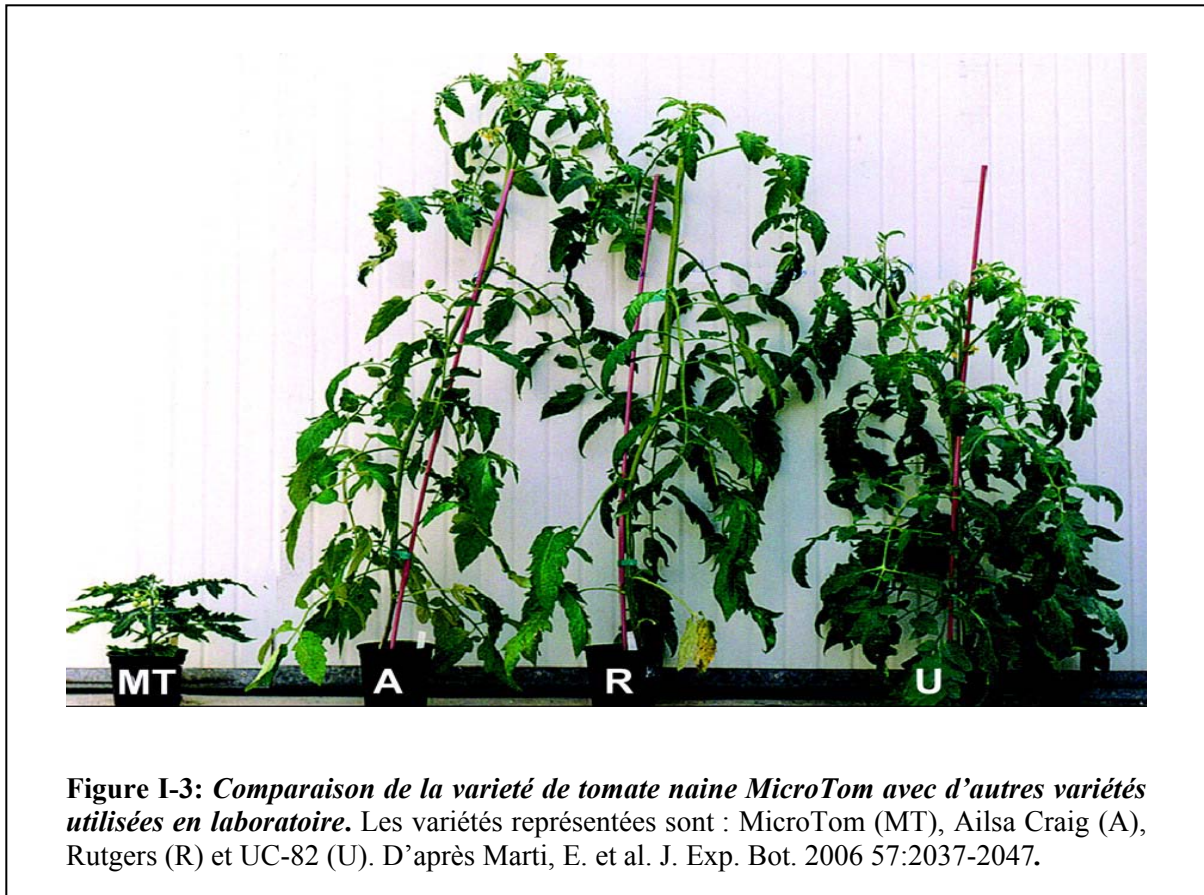
D'un point de vue scientifique, le choix de la tomate en tant que modèle est justifié par la disponibilité de nombreuses ressources génétiques et de génomiques. Au niveau génétique, la tomate est diploïde avec 12 paires de chromosomes ($2n=24$) et la taille de son génome est relativement petite (0.9 pg/génome haploïde, 950Mb) (Arumuganathan et Earle, 1994) bien que 6 fois environ plus élevée que celle d'*Arabidopsis thaliana* (0.15 pg/génome haploïde, 120 Mb) et deux fois plus élevée que celle du riz (*Oryza sativa* ; 0.45 pg/génome haploïde, 390 Mb). Un important travail de cartographie a permis, l'identification de plus de 2000 marqueurs moléculaires (Tanksley *et al.*, 1992, Haanstra *et al.*, 1999, Fulton *et al.*, 2002). Les cartes génétiques ont servi à l'identification et la localisation de QTL (Quantitative Trait Loci) qui influent sur de nombreux processus de développement et sur la qualité des fruits (Bucheli *et al.*, 1999; Doganlar *et al.*, 2002; Causse *et al.*, 2004). Les analyses QTL ont permis d'isoler des locus qui régulent la forme du fruit (Ku *et al.*, 1999), la taille (Grandillo *et al.*, 1999) et la durée de maturation (Doganlar *et al.*, 2002). Des lignées d'introgession ont été générées à titre d'exemple par Eshed et Zamir (1995) en croisement une espèce sauvage (*Solanum pennellii*) avec la tomate cultivée (*Solanum lycopersicum*) correspondant à 50 lignées introgressées réparties sur l'ensemble du génome. Ces lignées présentent des phénotypes variés incluant un développement du fruit et une maturation altérés. Il existe par ailleurs plus de 900 mutants monogéniques (correspondant à plus de 600 loci) dont un grand nombre sont affectés dans le processus de maturation. Ces mutants, dérivés de mutations spontanées et de variants naturels de la tomate cultivée ou de tomates sauvages, sont déposés au Centre CM Rick de ressources génétiques de la tomate à l'université de Davis, Californie (<http://tgrc.ucdavis.edu>). Des banques d'ADN génomiques sont disponibles et un programme de séquençage d'EST a été réalisé à partir de plus de 20 banques d'ADNc de différents tissus. La base de données Solanaceae Genomic Network (SGN) contient environ 240 000 EST dont 35 000 non redondants. A partir de ces EST, des micro-réseaux d'ADN ont été réalisés et ont permis d'effectuer des profils d'expression transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes. L'intérêt de ces outils pour l'étude de la physiologie et du développement des plantes et en particulier pour l'étude du développement et de la maturation de la tomate est décrit par Alba *et al.*, (2004). Des biopuces à oligonucléotides sont également disponibles. Commercialisé par Affimétrie ces biopuces comprennent 10 000 sondes synthétisés à partir des séquences d'unigènes établies à partir du programme de séquençage d'EST de tomates (*Solanum Lycopersicum* UniGene Build #20, Octobre, 2004). D'autres outils extrêmement prometteurs sont en voie de création grâce à des programmes importants. En particulier, le programme international de séquençage du génome de la tomate a été lancé en 2004 (Mueller *et al.*,

2005). Il a pour objectif de séquencer dans un premier temps les parties riches en gènes localisées dans l'euchromatine (approximativement 220 Mb). Ce projet est coordonné par un consortium international (International Solanaceae Genome Project (SOL) consortium) illustré dans la figure I-2, dans lequel notre laboratoire est impliqué en prenant en charge le séquençage du chromosome 7 (Delalande *et al.*, 2007). De plus, un programme de TILLING (Colbert *et al.*, 2001) permettant d'isoler rapidement des mutants alléliques de gènes d'intérêt à été mis en place par l'INRA de Bordeaux (http://www.competences.u-bordeaux1.fr/fiche_structure.php?struct=TILLING-Tomate) et par l'INRA d'Evry (<http://www.evry.inra.fr/public/index.html>).



L'avantage de cette espèce en tant que modèle expérimental réside également dans sa facilité de culture. En effet, cultivable en serre et chambre de culture, elle est de reproduction facile autant par semis que par bouture, les fécondations croisées sont aisées, son cycle végétatif est assez court, permettant ainsi l'obtention de 3 à 4 générations par an selon le cultivar. Dans cette étude la variété MicroTom a été principalement utilisée (figure I-3). Il s'agit d'une tomate miniature (10 à 20 cm de hauteur) initialement produite pour des considérations ornementales en croisant les cultivars Florida Basket et Ohio 4013-3. Elle présente un phénotype semi-nain (Scott et Hambaugh, 1989) et son cycle de développement

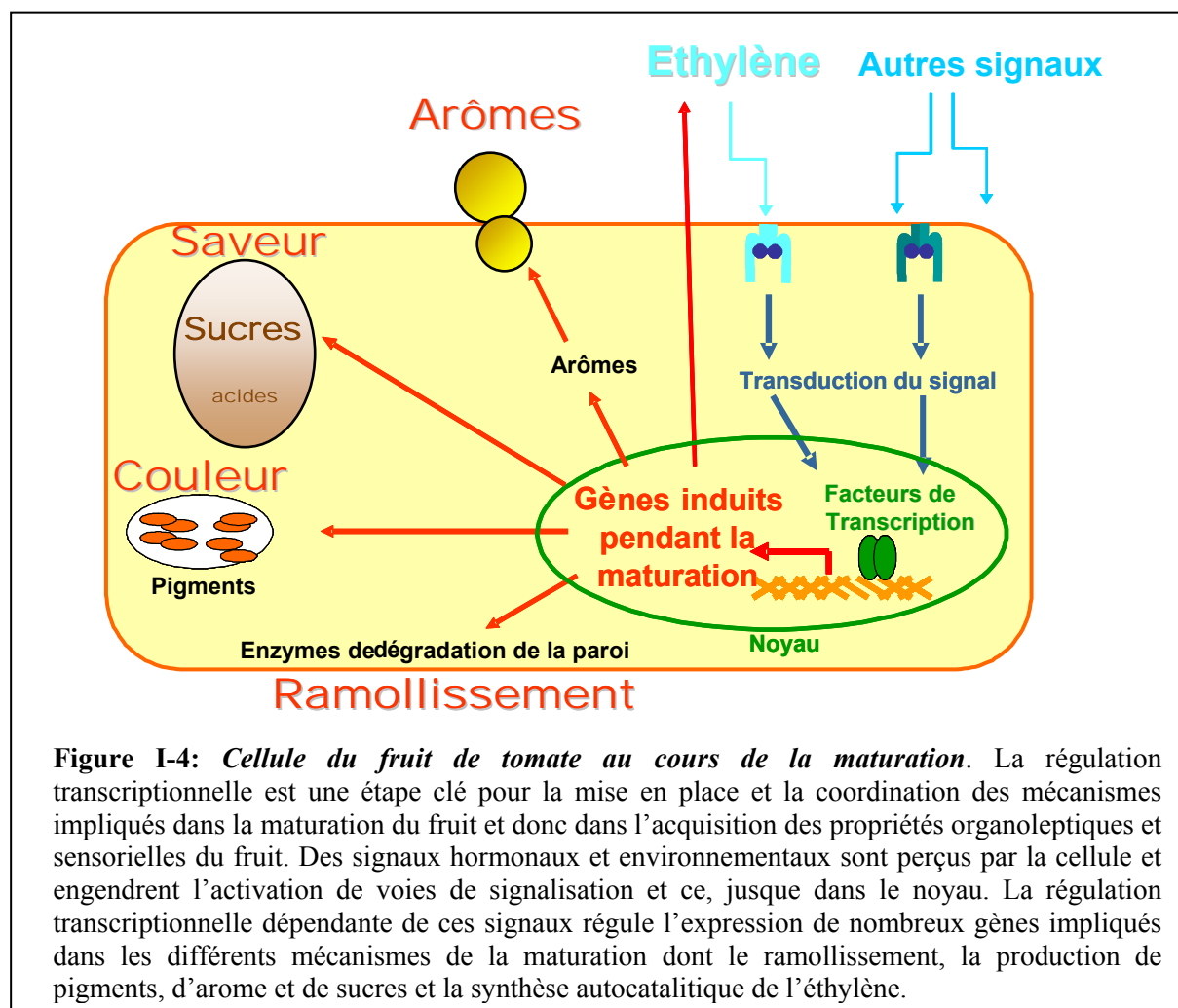
s'étend sur 70 à 90 jours du semis au fruit mûr (Emmanuel et Levy, 2002). Ainsi, il est possible de la cultiver à haute densité tout en obtenant quatre générations par an. La tomate présente également l'avantage d'être assez facilement transformable. En effet, sa transformation génétique à partir de cotylédons, *via* un vecteur biologique *Agrobacterium tumefaciens* est bien maîtrisée (Sun *et al.*, 2006) et de ce fait, elle est réalisée en routine par un plateau technique au sein du laboratoire d'accueil. Ainsi la tomate, et en particulier MicroTom est couramment utilisée pour de la mutagenèse en génomique fonctionnelle (Meissner *et al.*, 2000; Emmanuel et Levy, 2002 ; Marti *et al.*, 2006).



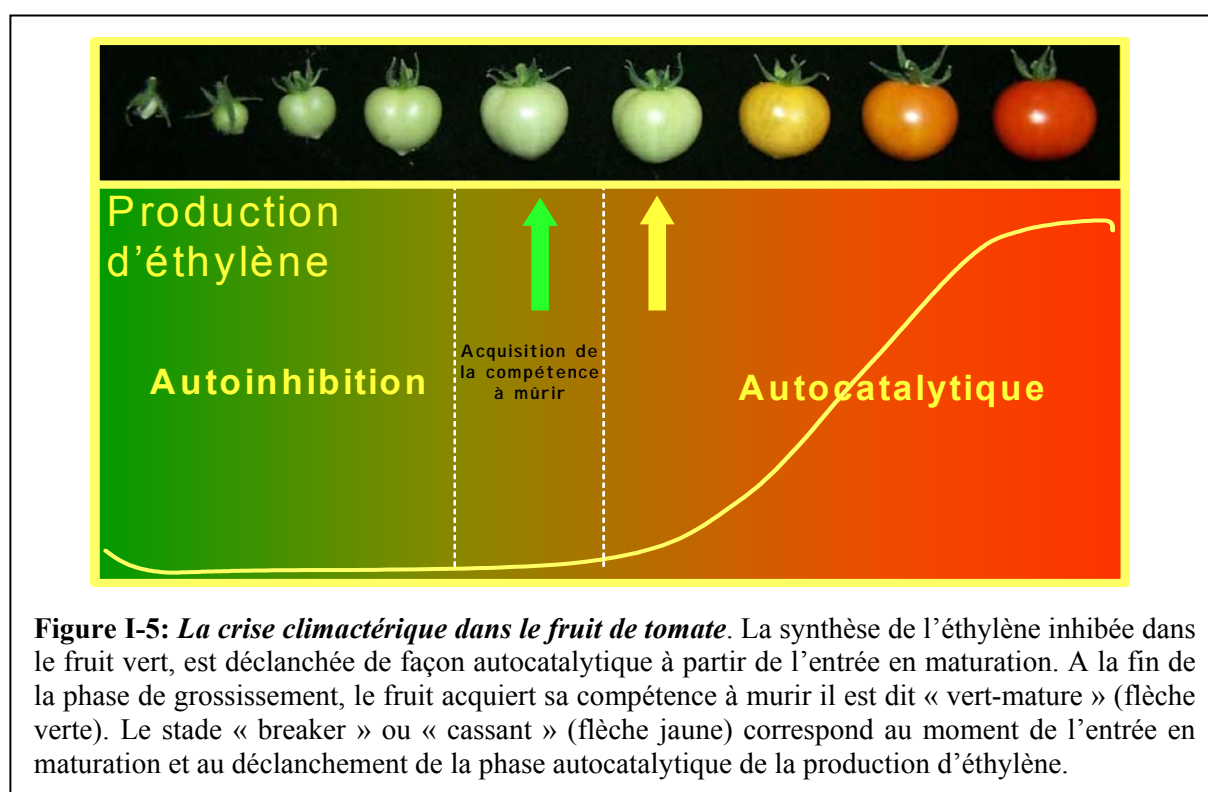
1-2 La maturation des fruits charnus

La maturation du fruit est un processus complexe dont la finalité est de rendre le fruit attractif et de promouvoir ainsi sa consommation par des organismes qui vont faciliter la libération et la dispersion de ses graines. La maturation est un phénomène génétiquement programmé, impliquant des bouleversements biochimiques, physiologiques et structuraux

dans l'ensemble des tissus du fruit. Celles-ci se traduisent par de nombreuses modifications coordonnées, notamment un changement de couleur et du contenu nutritionnel, un basculement de la balance acide/sucre par conversion de l'amidon en sucres, la production d'arômes et le ramollissement (figure I-4). La plupart de ces modifications résultent de nouvelles activités enzymatiques ou non-enzymatiques qui apparaissent à partir de l'entrée en maturation. Par exemple, la perte de fermeté du fruit résulte de la néo-synthèse et/ou de l'activation, pendant la phase de maturation, de protéines impliquées dans le relâchement de la paroi ayant des activités spécifiques complémentaires visant à modifier et/ou hydrolyser les composants de la paroi. Ainsi, certaines protéines pariétales comme les expansines, sont impliquées dans les modifications structurales des parois permettant ainsi d'accroître l'accessibilité à des enzymes ayant une activité hydrolytique comme les polygalacturonases (Powell *et al.*, 2003). Des activités enzymatiques spécifiques sont également impliquées dans la modification de la couleur du fruit. Ici, deux mécanismes participent simultanément, il s'agit d'une part, de la dégradation de la chlorophylle par des chlorophyllases (Jacob-Wilk *et al.* 1999) et d'autre part de la néo-synthèse de pigments colorés, majoritairement des caroténoïdes dont la phytoène synthase est une des enzymes clé (Gray *et al.*, 1992).



Les fruits charnus, selon qu'ils présentent ou non une phase climactérique pendant la phase de maturation, peuvent être divisés en deux groupes. Les fruits dits climactériques tels que la tomate, la pomme, la banane et l'abricot présentent une crise climactérique qui se caractérise par une forte augmentation de la respiration, accompagnée par une forte production d'éthylène (figure I-5). En revanche, les fruits dits non-climactériques tels que le raisin, la fraise et les agrumes ne connaissent pas de crise respiratoire, ni de pic d'éthylène. Le développement des fruits climactériques se déroule en deux étapes, une phase développementale aboutissant à l'acquisition de la compétence à mûrir, puis une phase climactérique dépendante de l'éthylène et qui, une fois enclenchée peut se poursuivre même si le fruit est détaché de la plante. Les fruits non-climactériques se distinguent sur ce point par leur incapacité à mûrir après récolte. Pour tous les fruits charnus, c'est au cours du processus très régulé de maturation que s'élaborent les qualités organoleptiques du fruit. Le contrôle et la coordination de ces événements est dépendant d'une régulation spatio-temporelle fine, elle même orchestrée par un ensemble de facteurs hormonaux et environnementaux. Les bases hormonales et moléculaires de la mise en place de ce processus, ont fait l'objet de nombreuses recherches au cours de ces dernières années. Chez les fruits climactériques comme la tomate, le dégagement autocatalytique de l'éthylène qui accompagne la maturation est prépondérant pour l'induction des modifications biochimiques et physiologiques telles que le changement de couleur, ou encore la perte de fermeté. Ainsi, de nombreux travaux de recherche sur la maturation se sont particulièrement focalisés sur l'éthylène.



1-3 L'éthylène : l'hormone clé de la maturation du fruit

L'éthylène est une phytohormone essentielle pour le développement, la survie et la défense des plantes. L'effet de l'éthylène le plus décrit est l'induction de la maturation des fruits climactériques. En effet, il est connu depuis longtemps que l'apport d'éthylène exogène déclenche le mûrissement des fruits verts aptes à mûrir et accélère le processus de mûrissement déjà initié (Yang et Hoffmann, 1984). Cependant, de nombreux travaux illustrent son implication dans beaucoup d'autres processus parmi lesquels : l'abscission, la sénescence, la germination, la croissance des racines, la synthèse de pigments, la défense contre les attaques de pathogènes et les stress abiotiques (Wang *et al.* 2002). L'éthylène est un gaz produit dans la plupart des tissus végétaux à différents stades de développement (Yang et Hoffman, 1984) et il est capable de diffuser à partir de son site de synthèse. L'ACC synthase (ACS) convertit son précurseur, la S-Adénosyl méthionine (SAM) en 1-aminocyclopropane-1-carboxylique acide (ACC) qui est converti en éthylène par l'ACC oxydase (ACO).

Dans les fruits climactériques, la synthèse de l'éthylène est déclenchée au moment de l'entrée en maturation et devient par la suite autocatalytique (figure I-5). De plus, l'application d'inhibiteurs de l'action de l'éthylène comme le 1-méthyl-cyclopropène (MCP) a un effet inhibiteur de la maturation (Sisler et Serek, 1997). C'est pourquoi, l'éthylène est considéré comme l'hormone clé pour la mise en place et le déroulement du processus de maturation des fruits. En ce qui concerne la perte de fermeté du fruit, l'étude de l'expression des gènes codant les hydrolases pariétales a montré que nombre d'entre elles sont induites spécifiquement au cours de la maturation et régulées positivement par un traitement à l'éthylène (Harrimann *et al.*, 1991 ; Gonzalez-Bosch *et al.*, 1996 ; Smith *et al.*, 1998). Concernant la synthèse d'arômes, il a été décrit chez le melon, que l'expression de certains gènes de la famille des alcool déshydrogénases (ADH) et des alcool acyl transférases (AAT) est sous la stricte dépendance de l'éthylène (Flores *et al.*, 2002 ; El-Sharkawy *et al.*, 2005 ; Manriquez *et al.*, 2006). Or, ces protéines sont des enzymes clés de la voie de biosynthèse d'esters qui sont des composés volatils contribuant à l'arôme de nombreux fruits.

Le clonage des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'éthylène (Hamilton *et al.*, 1990 ; Nakatsuka *et al.*, 1998 ; Barry *et al.*, 2000) ainsi que de ceux impliqués dans la perception et la transduction du signal éthylène (Guzman and Ecker, 1990 ; Giovannoni, 2001) a permis d'importantes avancées par les approches moléculaires pour l'étude de la

régulation de la maturation des fruits climactériques. Initialement, les travaux visant à modifier le déroulement de ce processus ont porté sur des gènes régulés par l'éthylène et plus particulièrement ceux codant les deux enzymes de sa voie de biosynthèse. Il en est ainsi de tomates dans lesquelles l'expression des gènes de biosynthèse de l'éthylène a été inhibée (ACO : Hamilton *et al.*, 1990 ; ACS : Oeller *et al.*, 1991) ou dans lesquelles des gènes capables de métaboliser l'ACC ou la SAM ont été surexprimés (Klee *et al.* 1991, Good *et al.*, 1994). Des travaux similaires ont été menés sur des fruits d'autres espèces : l'ACO chez le melon (Ayub *et al.*, 1996); l'ACO et l'ACS chez la pomme (Castiglione *et al.*, 1998). L'ensemble de ces travaux montre qu'une diminution de la concentration ou un retard de production d'éthylène dans le fruit est une stratégie efficace pour altérer la mise en place et le déroulement de la phase de maturation permettant ainsi une meilleure conservation du fruit après récolte. Ces lignées transgéniques altérées dans leur synthèse d'éthylène, ont également permis de distinguer des phénomènes de mûrissement dépendants et indépendants de l'éthylène. En effet, l'accumulation des sucres n'est pas affectée par l'absence ou la diminution de l'éthylène. De même la régulation de l'expression des protéines pariétales impliquées dans le ramollissement du fruit n'est que partiellement contrôlé par l'éthylène. Par exemple, dans la famille des gènes codant une ACO chez le melon, certains membres sont régulés par l'éthylène et d'autres non (Guis *et al.* 1997). D'autres approches visant à étudier les implications de l'éthylène dans la régulation de la maturation du fruit, ont consisté à utiliser des mutants de perception ou de réponse à cette hormone. Ces mutants sont incapables de répondre à une augmentation de la production d'éthylène lors de la maturation. On peut citer par exemple, les mutants *rin* (ripening inhibitor) et *nor* (non-ripening). Le clonage positionnel du locus *rin* a révélé qu'il s'agissait d'une fusion de deux gènes de types MADS box, gènes homéotiques contrôlant le développement des carpelles, mais que seul l'un d'entre eux est nécessaire pour la maturation (Vrebalov *et al.*, 2002). *Nor* code un facteur de transcription (Giovanonni *et al.*, 2001) mais les mécanismes d'action de cette protéine ne sont pas encore bien identifiés. Parmi les mutants de la maturation du fruit identifiés sur la base de leur insensibilité à l'éthylène on peut également citer, *Never-ripe* (*Nr*) (Lanahan *et al.*, 1994), *Green-ripe* (*Gr*) et *Never-ripe 2* (*Nr2*) (Barry *et al.*, 2005). Depuis, la mise en évidence du rôle de *Nr* en tant que récepteur de l'éthylène, un grand nombre de récepteurs ont été clonés et analysés dans plusieurs espèces (Adams-Phillips *et al.*, 2004; revue). Cependant, l'analyse de plantes transgéniques exprimant très faiblement *Nr* a montré que ce gène n'est pas nécessaire pour la mise en place et l'accomplissement du programme de maturation (Hackett *et al.*, 2000) suggérant que d'autres récepteurs fruit-spécifiques de la famille peuvent compenser

cette déficience (Tieman *et al.*, 2000). Les mutants spontanés *Gr* et *Nr2* identifiés dans les années 80 (Jarret *et al.*, 1984) ont été récemment caractérisés physiologiquement (Barry *et al.*, 2005). De plus, il semblerait que ces mutants soient alléliques (Barry et Giovannoni, 2006). On peut aussi citer le cas du mutant *Cnr* (*Colorless non-ripening*), qui présente une absence de coloration des tissus du péricarpe ainsi qu'une perte excessive d'adhésion cellulaire (Thompson *et al.*, 1999). Au cours de la maturation, ce mutant présente une altération de l'expression et de l'activité d'une large gamme d'enzymes de la dégradation des parois cellulaires. Il a été suggéré que *Cnr* résulterait d'une mutation épigénétique spontanée du gène SBP-box (Squamosa promoter Binding Protein-like) localisé récemment par clonage positionnel par Manning *et al.* (2006).

2- La régulation transcriptionnelle chez les eucaryotes

Les cellules d'un même organisme multicellulaire sont dotées d'un patrimoine génétique identique, cependant elles diffèrent les unes des autres par leur transcriptome, leur protéome et leur métabolome qui dépendent de l'expression génique. Ainsi, le niveau d'information diffère en fonction du type cellulaire, du niveau de différenciation, du stade de développement et des différents stimuli perçus par la cellule. Ces variations de l'expression génique permettent à la cellule d'assurer des fonctions très diverses, notamment en ce qui concerne les métabolismes secondaires. Cette expression est soumise à une régulation temporelle et spatiale fine et complexe. L'acide désoxyribonucléique (ADN) est le support de l'information génétique, il contient des séquences codantes qui sont transcrites en acides ribonucléiques messagers (ARNm) par des ARN polymérases ADN dépendantes, avant d'être traduits en protéines. Ces étapes intermédiaires entre le gène et la protéine constituent une opportunité de choix entre les différents gènes à transcrire et constituent donc des étapes clés dans la régulation génique.

La première étape de la régulation transcriptionnelle d'un gène consiste en une intégration de signaux hormonaux ou environnementaux, conduisant à une modification du niveau de transcription du gène cible. Par exemple, dans le cas de la maturation des fruits, la perception de l'éthylène, conduit, via des chaînes de transduction, à la stimulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la mise en place et le déroulement du processus de maturation (paragraphe 1-3). La spécificité de l'expression génique est au moins partiellement gouvernée par des activateurs ou répresseurs transcriptionnels qui sont des protéines dont la plupart agissent en se liant à l'ADN d'une manière séquence-spécifique. Ces protéines régulatrices sont elles-mêmes soumises à une régulation au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Nous décrirons tout d'abord les mécanismes généraux de la transcription, puis le rôle du promoteur dans la régulation de ce processus et enfin, les différents types de facteurs de transcription et en particulier la famille des co-facteurs de transcription dont fait partie la protéine ER24 étudiée dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

2-1 Définition générale

La transcription est le processus de copie du matériel génétique ADN en ARN (figure I-6). Chez les procaryotes une seule ARN polymérase-ADN dépendante effectue la transcription pour tous les types d'ARN, tandis que chez les eucaryotes, trois ARN polymérases (ARNpol) interviennent : l'ARNpol I pour les ARN ribosomiques transcrits dans le nucléole (28S, 18S et 5,8S), l'ARNpol II pour les ARN messagers (ARNm), et l'ARNpol III pour les petits ARN (ARNt, ARNr 5S, ARNsn). Le mécanisme de la transcription est divisé en trois grandes étapes : l'initiation (synthèse des premiers nucléotides), l'élongation (allongement de la chaîne d'ARN) et la terminaison (libération du pré-ARN messenger, et départ de la machinerie de transcription de l'ADN). C'est principalement l'étape d'initiation de la transcription des gènes qui s'avère primordiale pour le choix des gènes à transcrire au cours des différents processus cellulaires, elle constitue donc une étape clé pour la régulation de l'expression des gènes. En effet, tout l'ADN n'est pas transcrit, seules les régions codantes le sont et le choix des gènes à transcrire se fait selon le stade de développement, le type cellulaire et l'environnement de la cellule. Et c'est au cours de l'initiation de la transcription que ces régulations spatiales, temporelles et environnementales vont se mettre en place. Dès lors, différents acteurs interviennent pour déterminer à quel endroit et dans quelles conditions une région d'ADN doit commencer à être transcrite. Ce rôle est assuré par les promoteurs et les facteurs régulateurs de la transcription.

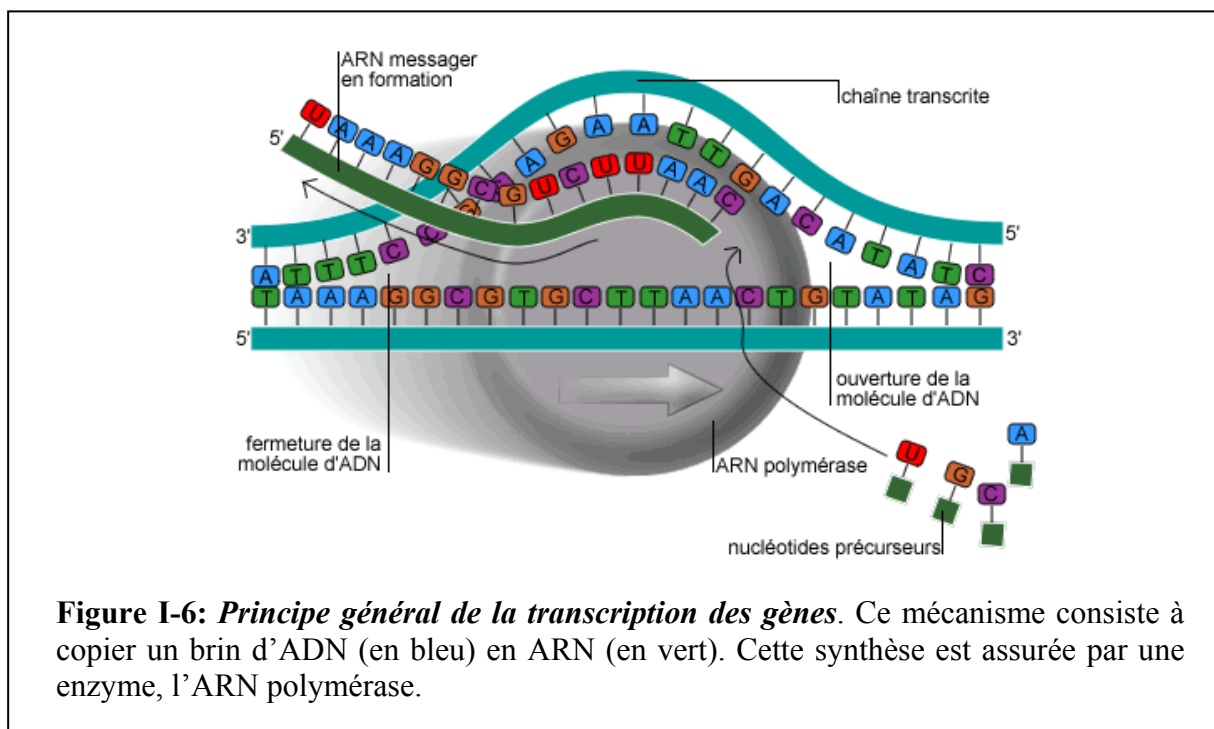


Figure I-6: Principe général de la transcription des gènes. Ce mécanisme consiste à copier un brin d'ADN (en bleu) en ARN (en vert). Cette synthèse est assurée par une enzyme, l'ARN polymérase.

2-2 Le promoteur

Le promoteur a pour fonction de déterminer le moment, les conditions et le niveau d'expression du gène auquel il est associé. Il correspond à une région non transcrite de l'ADN, généralement en amont de la région codante du gène, dont la séquence permet, entre autre, le recrutement de l'ARNpol II. Certaines séquences du promoteur appelées « boîtes » régulatrices ont une importance particulière dans ce processus car elles autorisent le contrôle de l'expression du gène par des protéines régulatrices. Ainsi, ces courtes séquences permettent d'adapter le niveau d'activité d'un gène aux besoins physiologiques et en fonction du niveau de différenciation des cellules. Les éléments de régulation ont été classés en deux types, selon leur distance par rapport au site d'initiation de la transcription : les séquences régulatrices proximales regroupées dans le promoteur central et les séquences régulatrices distales.

2-2-1 Le promoteur central

La région centrale du promoteur est située juste en amont de la séquence codante du gène. C'est dans cette région proximale du promoteur que se fixe l'ARNpol, elle comprend le site d'initiation de la transcription et contient la « TATA box » qui est située environ 25 pb en amont de celui-ci. Le promoteur central est incapable, à lui seul, d'assurer une transcription efficace de la séquence codante située en aval. D'autres éléments proximaux situés entre 100 et 200 pb du site d'initiation sont également impliqués dans la régulation de la transcription. La « CAT box » fonctionne comme l'une des séquences agissant en *cis*, de même qu'un segment continu riche en GC. La mutation de ces éléments centraux a des conséquences significatives sur le taux de transcription et se traduit par une forte diminution ou un blocage de la transcription (Griffiths and Anthony, 2001).

2-2-2 Les régions promotrices distales

Certaines séquences promotrices appelées *cis*-éléments sont parfois situées jusqu'à plusieurs milliers de paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription et sont nécessaires pour le contrôle de l'expression du gène. Ces séquences sont appelées «*enhancer*» lorsqu'elles sont activatrices et «*silencer*» lorsqu'elles sont inhibitrices.

Trois modèles coexistent pour expliquer la régulation de la transcription par ces séquences (Tang *et al.*, 2002). Un premier modèle, appelé «*looping* », suggère que l'ADN se courbe et forme une boucle pour permettre aux activateurs fixés sur des régions régulatrices

de contacter les facteurs généraux de la transcription. Un deuxième modèle, appelé « *linking* », suggère que des régions de contrôle permettent d'établir une structure chromatinienne (activatrice ou inhibitrice) qui se propage jusqu'au gène à réguler (Bulger and Groudine, 1999). Le troisième modèle, appelé « séquentiel », suggère que des domaines de régulation permettent la relocalisation nucléaire du gène dans une région du noyau riche en facteurs déstabilisants pour la compaction de la chromatine, et l'activation de la transcription du gène (Francastel *et al.*, 2001 ; Tang *et al.*, 2002).

De nombreux *cis*-éléments régulateurs ont été identifiés et caractérisés chez les plantes, ces éléments sont classés en fonction du type de stimulus auquel ils répondent ou bien en fonction du type de processus qu'ils régulent. A titre d'exemple, les travaux concernant les mécanismes de contrôle de la photorégulation de l'expression génique et en particulier, la caractérisation des promoteurs des gènes *LHCB* (Light-Harvesting Chlorophyll a/b-Binding protein) et *RBCS* (Ribulose-1,5-Biphosphate Carboxylase/oxygenase Small subunit) ont permis l'identification d'éléments de réponse à la lumière. Ce sont entre autres, les motifs « I-BOX », « AT1 », « G-Box » et « CATT-motif » (Gilmartin *et al.* 1990). Pour l'analyse des régions promotrices des gènes visant à l'identification de *cis*-éléments putatifs, des outils de bioanalyse sont disponibles. On peut citer par exemple les bases de données spécialisées référençant plusieurs centaines de *cis*-éléments identifiés chez les plantes, tels que PLACE (www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE) et PlantCARE (serveur www.bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare).

Le génome compte de multiples séquences d'ADN qui participent à la régulation de l'expression des gènes. Pour être fonctionnelles, ces séquences d'ADN doivent être reconnues par des facteurs protéiques spécifiques. Ceci implique que ces séquences soient situées dans des régions de la chromatine suffisamment décondensées pour être accessibles aux différentes protéines.

2-3 Les acteurs protéiques de la transcription

La régulation de la transcription des gènes est assurée en partie par l'intervention de facteurs protéiques agissant en « *trans* ». Certains de ces facteurs sont capables de se lier directement à l'ADN et d'autres interviennent dans des complexes protéiques sans se lier à

l'ADN. L'association de l'ensemble de ces protéines en complexes de haut poids moléculaire permet de réguler la transcription du gène en fonction des signaux cellulaires.

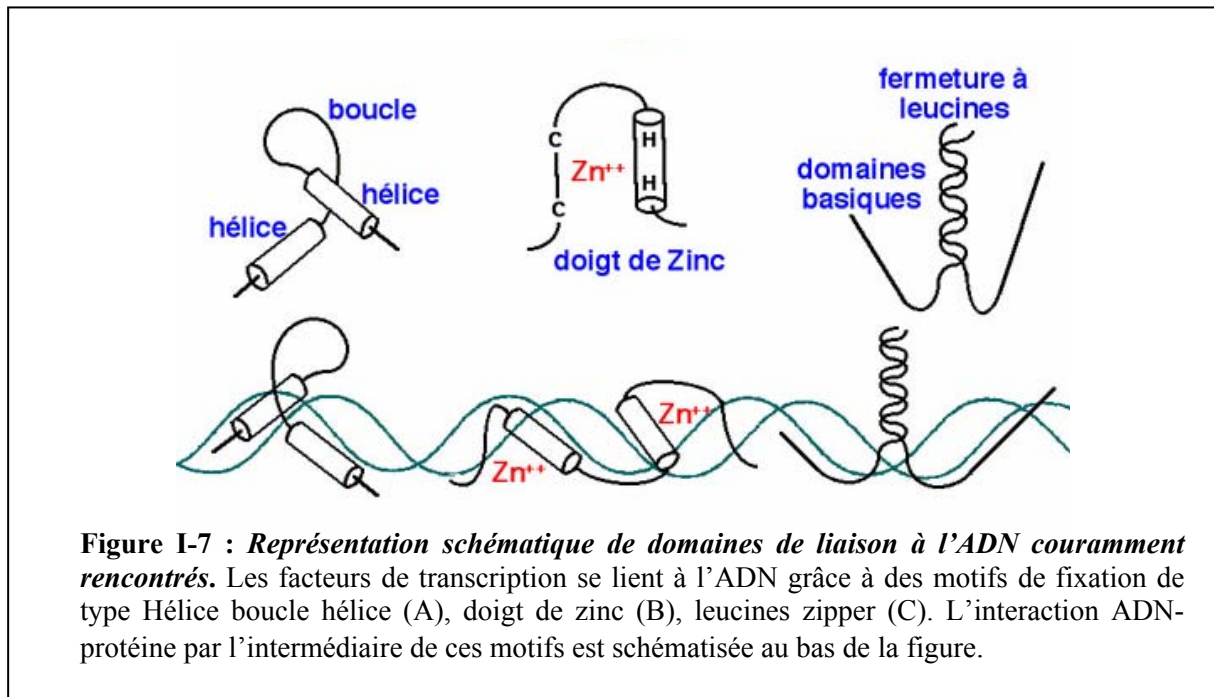
2-3-1 Les facteurs de transcription

L'un des processus majeur de la régulation de l'expression des gènes en réponse aux besoins spécifiques de chaque cellule est assuré par les facteurs de transcription. Ces protéines nucléaires sont capables de reconnaître et de se lier avec des régions promotrices de gènes cibles. Deux types de facteurs de transcription participent à la régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes : les facteurs généraux de la transcription qui interagissent avec la machinerie basale de la transcription au niveau du promoteur central et les facteurs de transcriptions spécifiques interagissant avec les régions distales des promoteurs.

Les facteurs de transcription peuvent être régulés de par leur concentration et leur activité. De façon générale, la synthèse et l'activité des facteurs de transcription peuvent être contrôlée au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel. Mais leur activité peut être également régulée *via* des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation, glycosylation) et dépendre de leur localisation subcellulaire, des interactions avec d'autres protéines ou encore de la fixation d'un ligand. Les facteurs de transcription possèdent généralement deux domaines caractéristiques : un site de liaison direct à une séquence spécifique d'ADN et un domaine d'activation ou de répression qui permet au facteur de transcription d'interagir avec des co-facteurs pour contrôler (activer ou réprimer) l'activation de la machinerie basale. De façon générale, ces facteurs se fixent au niveau des éléments régulateurs spécifiques du promoteur localisés entre les nucléotides -400 et -100 mais certains d'entre eux peuvent exercer leurs effets sur des distances plus importantes, jusqu'à 30 kb en amont du gène.

Dans la famille des facteurs de transcription, il existe plusieurs catégories de structures protéiques ou motifs de fixation capables de lier l'ADN (figure I-7). Les plus fréquentes sont les motifs en doigts de zinc, les homéodomaines (HD) et les domaines riches en acides aminés basiques ou « leucine zipper » (Mitchell and Tjian, 1989). Les protéines présentant des motifs en doigts de zinc permettent d'activer la transcription en se liant à des régions riches en GC. Les protéines contenant des motifs HD reconnaissent généralement des structures d'ADN riches en bases AT (Fainsod *et al.*, 1986). Enfin, les domaines « leucine zipper » sont capables de former des structures en hélice compatibles pour établir des liaisons avec l'ADN. Certains facteurs de transcription tels que CREB, Jun et Fos sont capables de se lier à l'ADN

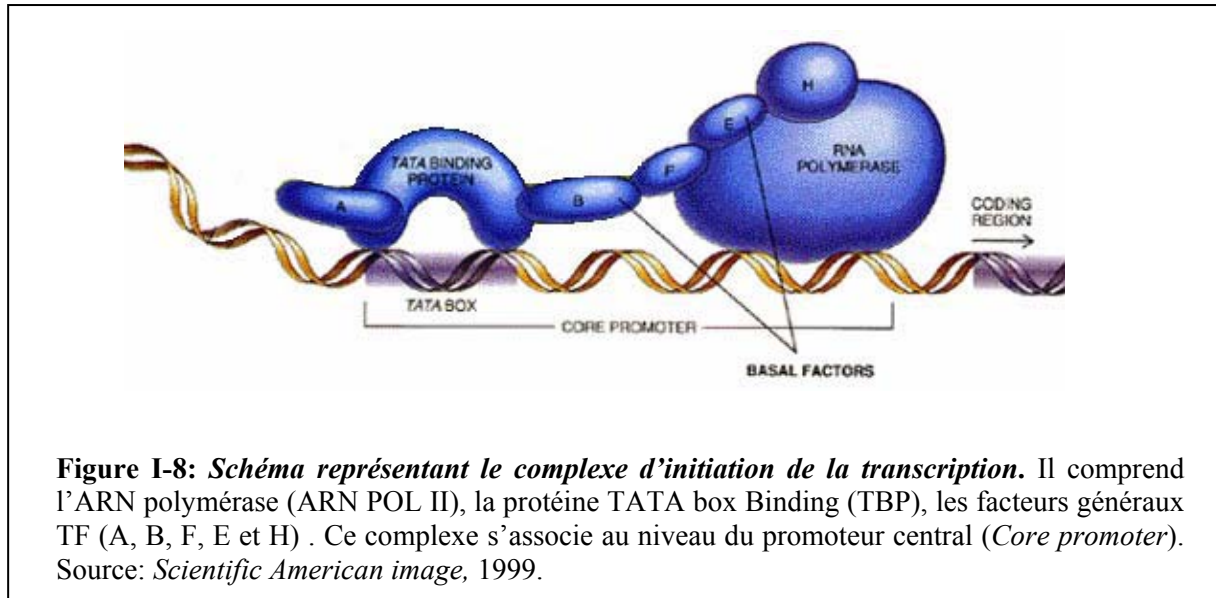
sous la forme d'un dimère. La présence de domaines « *leucine zipper* » permet cette dimérisation et les régions basiques adjacentes favorisent l'interaction entre le facteur de transcription et l'ADN (revue dans Mitchell and Tjian, 1989).



Les domaines d'activation des facteurs de transcription sont généralement des parties (une ou plusieurs) de la protéine qui sont enrichies par un type d'acide aminé. Il a été ainsi mis en évidence des domaines d'activation riches en acides aminés acides comme l'acide aspartique, la glutamine ou la proline. Ces régions facilitent généralement des interactions avec des co-facteurs et sont parfois la cible de modifications post-traductionnelles de type phosphorylation ou acétylation qui permettent l'activation du facteur en question ou bien des co-facteurs associés (Brivanlou and Darnell, 2002; Mitchell and Tjian, 1989).

> **Les facteurs généraux de la transcription** (figure I-8) sont impliqués dans la mise en place du complexe d'initiation de la transcription. Ainsi, pour que l'ARNpol II puisse assurer la transcription avec un rendement maximum, une coopération entre de multiples éléments *trans*-régulateurs est nécessaire. Parmi les éléments connus il y a les facteurs de transcription de type TFII ou facteurs généraux notés: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH. Ces facteurs forment avec la polymérase un complexe autour du site d'initiation appelé complexe basal de transcription. Tous les promoteurs ont besoin d'un appareil de transcription basal pour être capables de promouvoir la transcription. Les facteurs TFII sont essentiels pour

activer la transcription mais ne peuvent pas, par eux-mêmes, augmenter ni abaisser le taux de transcription. Cette tâche revient aux activateurs et aux répresseurs transcriptionnels. Ces facteurs communiquent avec les facteurs TFII par le biais de co-activateurs ou d'adaptateurs.



L'assemblage du complexe d'initiation de l'ARN polymérase II commence par la fixation de TFIID à la TATA box. TFIID est composé d'une sous-unité se fixant à la TATA box appelée TATA-box Binding Protein (TBP) et de plus de huit autres sous-unités appelés TAF (TBP Associated Factors). La fixation de la TBP à l'ADN va positionner l'ARNpol II et permettre ainsi la formation du complexe de transcription fonctionnel. Certains inhibiteurs peuvent se fixer au complexe TFIID-promoteur, bloquant la fixation des autres facteurs élémentaires de la transcription. La fixation de TFIIA au complexe TFIID-promoteur empêche la fixation d'un inhibiteur. Le TFIIB se fixe alors au complexe et sa fonction serait de protéger l'ADN en proximité du site d'initiation de l'action des DNases. TFIIF forme un complexe avec l'ARN polymérase II et il est d'ailleurs possible que TFIIF transporte la polymérase jusqu'au site d'assemblage du complexe d'initiation. Enfin il a été avancé que TFIIIE et TFIIH doivent rejoindre le complexe pour que la transcription soit initiée. Il a été montré par ailleurs que TFIIH possède des activités hélicase, ATPase et kinase.

Les études concernant le complexe de transcription : sa mise en place, sa régulation et son fonctionnement, ont débuté par la caractérisation du premier facteur de transcription eukaryote cloné, le TFIID, lequel à l'époque était équivalent au polypeptide identifié comme « TATA-binding protéine » (TBP) une protéine de 30 kD (Lemon and Tjian, 2000). Par la

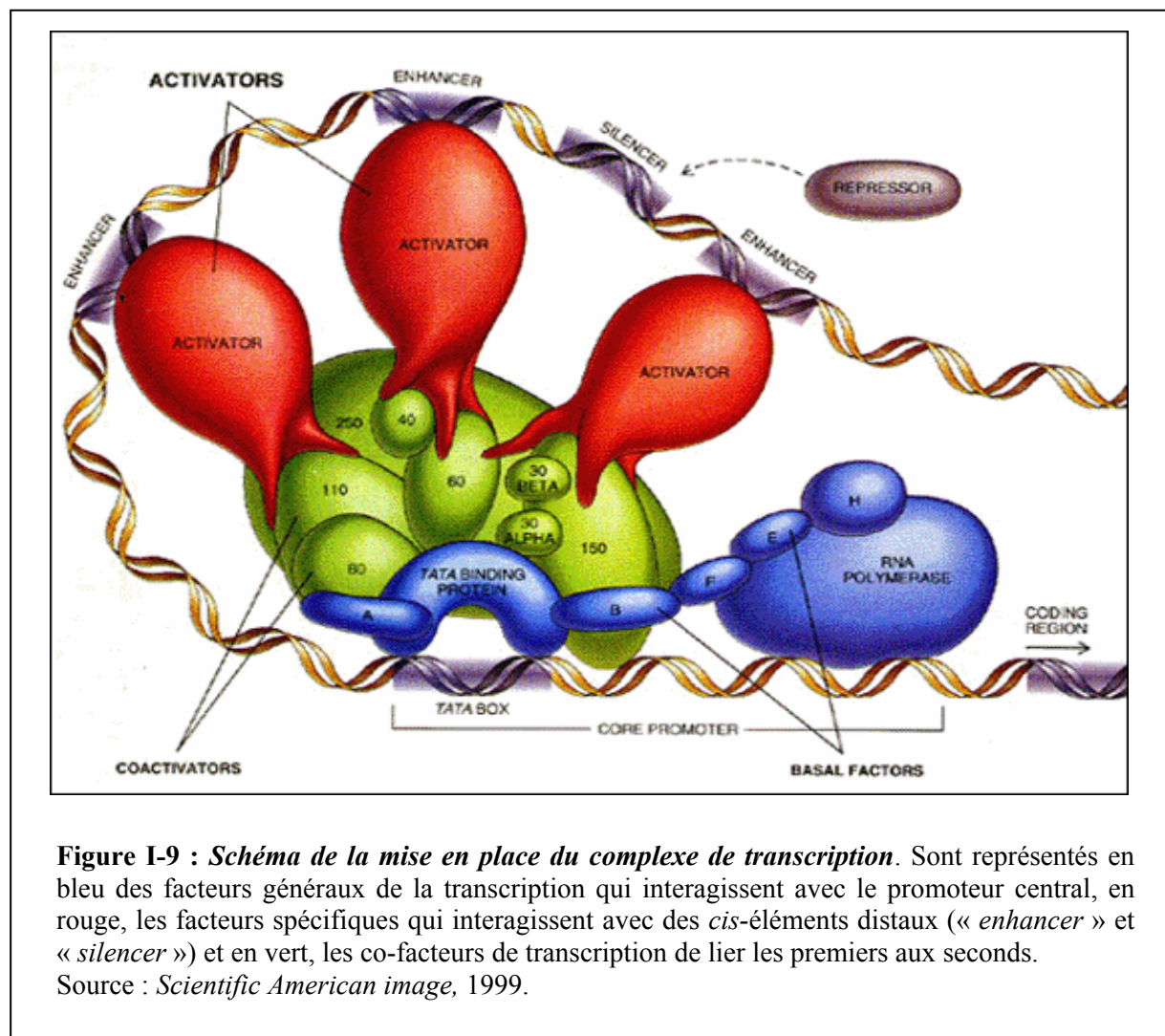
suite, il a été montré que la TBP était capable de remplacer la fraction protéique contenant TFIID pour initier une transcription basale, mais elle n'était pas capable de modifier l'activité transcriptionnelle en présence de facteurs régulateurs. La purification du TFIID a permis de montrer qu'il s'agissait d'un complexe qui contenait la TBP et les facteurs TAF qui lui sont associés. Cette découverte a permis de mettre en évidence une nouvelle classe de molécules, appelées co-activateurs ou adaptateurs, nécessaires pour transmettre l'information entre les protéines *trans*-activatrices qui interagissent avec l'ADN au niveau des *cis*-éléments distaux et le complexe basal contenant l'ARN polymérase (Lemon and Tjian, 2000). Une vaste étude portant sur le complexe TFIID a révélé que différentes classes d'activateurs peuvent interagir avec différents TAF pour moduler la transcription. En effet, comme il existe plusieurs facteurs de transcription qui interagissent avec l'ADN de manière séquence-spécifique, il existe aussi des co-activateurs transcriptionnels qui sont tissu-spécifiques (Goodrich and Tjian, 1994; Burley and Roeder, 1996). Par exemple, quelques sous-unités qui appartiennent au TFIID fonctionnent de manière tissu spécifique, c'est le cas de TAF105 chez l'homme qui est fortement exprimé dans les cellules B (Dikstein *et al.*, 1996).

> **Les facteurs de transcription spécifiques** sont associés aux facteurs généraux dans les complexes de transcription et ils interviennent dans la modulation de la transcription. Le complexe d'initiation composé de l'ARNpol II et des différents TFII est suffisant pour visualiser une activité transcriptionnelle *in vitro* mais à très faible taux. L'augmentation ou la répression de cette activité basale est sous la dépendance de facteurs spécifiques qui vont interagir avec le complexe d'initiation. Ainsi, pour activer un gène cible, différents stimuli internes et/ou externes entraînent la liaison d'un certain nombre de facteurs de transcription spécifiques à des séquences promotrices en amont de ce gène (Felsenfeld *et al.*, 1996). Alors que certains facteurs activateurs favorisent la transcription en provoquant notamment l'ouverture locale de la chromatine ou en stabilisant le complexe de transcription, d'autres appelés répresseurs, au contraire l'inhibent en provoquant une condensation de la chromatine ou, par la déstabilisation ou le blocage du complexe. Ces facteurs sont finement régulés au niveau de leur synthèse et de leur activité qui dépendent de voies de signalisations complexes. Les facteurs de transcription spécifiques sont le plus souvent classés en fonction du type de facteur auquel ils répondent. Par exemple, chez les plantes, des facteurs répondant spécifiquement à l'éthylène ont été caractérisés, ce sont les ERF (Ethylene Responsive Factors) (Ohme-Takagi et Sinshi, 1995), des gènes de réponse à l'auxine ont également été caractérisés ce sont les ARF (Auxine Response Factors) et les AUX/IAA (Auxin/Indole-3-

Acetic Acid). Les facteurs de transcription généraux et spécifiques interagissent dans des complexes multiprotéiques avec d'autres protéines régulatrices tels que les co-facteurs de transcription pour permettre l'activation ou la répression de la transcription (Brivanlou et Darnell, 2002).

2-2-2 Les co-facteurs transcriptionnels

Ce sont des protéines nucléaires médiatrices de la transcription. Elles permettent ou modulent l'interaction fonctionnelle entre des facteurs de transcription spécifiques et les facteurs généraux présents dans le complexe d'initiation de la transcription (figure I-9). Différents types de co-facteurs participent à la régulation de l'expression génique, en contribuant soit à l'activation de la transcription (co-activateurs), soit à son inhibition (répresseurs).



Ces co-facteurs ont la capacité de s'agencer en complexes multiprotéiques de haut poids moléculaire et sont impliqués dans un large éventail de fonctions. Certains co-activateurs agissent en recrutant directement la machinerie de transcription et en stabilisant le complexe de préinitiation. C'est le cas des protéines du complexe TAF qui se lient à la TBP. D'autres co-activateurs sont porteurs d'activités enzymatiques particulières et sont classés en deux catégories :

- certaines enzymes modifient la structure chromatinienne en induisant des modifications covalentes sur la queue N-terminale des histones. C'est le cas des histones acétyl transférases, des histones déacétylases, des kinases, des phosphatases, des ubiquitine ligases et des histones méthyl transférases (HMG),
- l'autre catégorie d'enzyme remodèle la structure de la chromatine en présence d'ATP (dépendant d'ATP), c'est le cas des complexes SWI/SNF (Switching/Sucrose-Non-Fermenting).

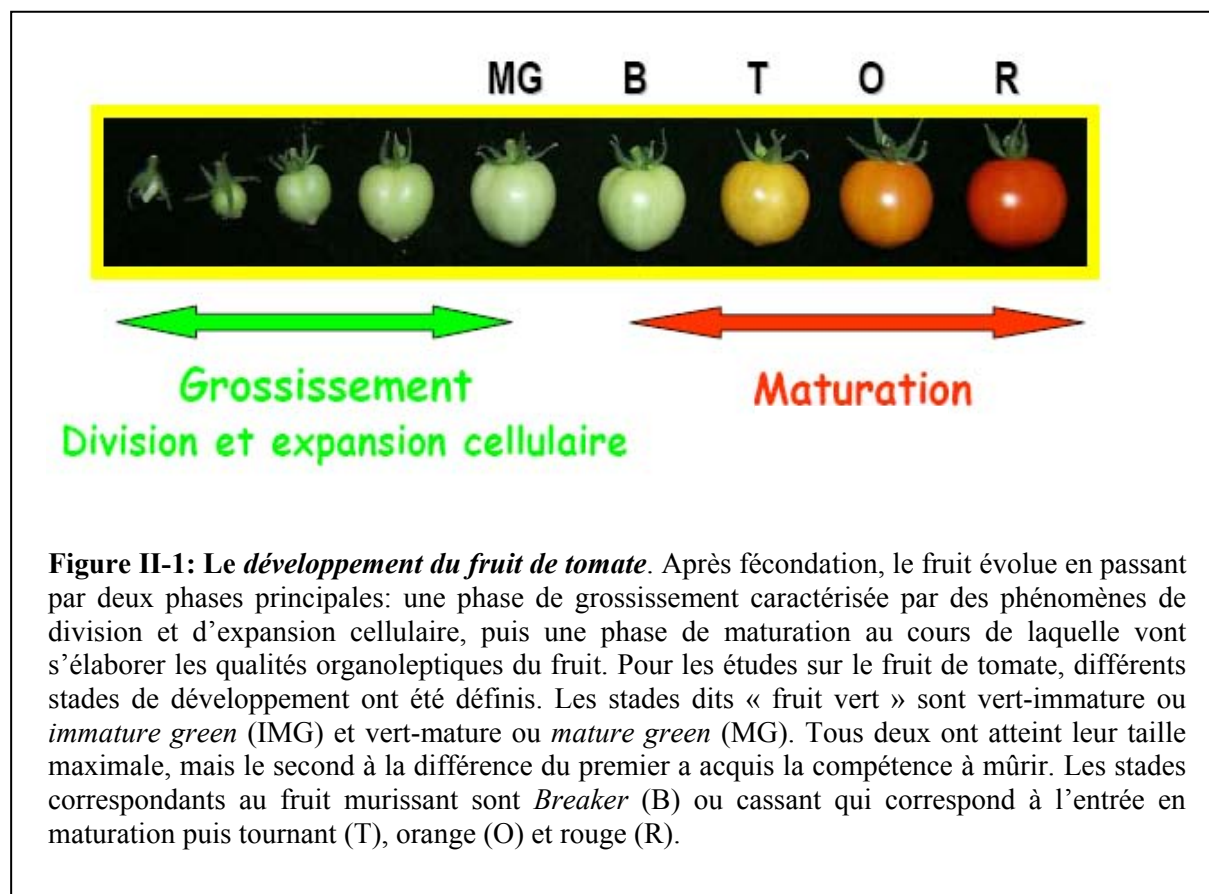
Pour établir une structure chromatinienne locale adéquate à l'initiation de la transcription, plusieurs types d'enzymes sont parfois nécessaires. Par exemple, les protéines acétylant les histones et celles qui remodèlent la chromatine agissent très souvent simultanément pour permettre une activation de la transcription optimale.

Chapitre II

Isolement et caractérisation de promoteurs fruit-spécifiques chez la tomate

1-Introduction

Le fruit est un organe de reproduction mais aussi de dissémination et de protection des graines, dont la mise en place est initiée par la différenciation d'un méristème somatique en structure reproductrice, l'ovaire. Après fécondation, celui-ci va évoluer en fruit en passant par différentes phases de développement avant de libérer ses graines. Ainsi, il connaît successivement une phase de division cellulaire, puis une phase de grandissement et finalement la maturation aboutissant à la sénescence de l'organe (figure II-1). C'est majoritairement au cours de cette dernière phase que se déroulent les phénomènes majeurs conférant aux fruits les qualités sensorielles qui les rendent attractifs pour le consommateur. Ces phénomènes résultent d'interactions complexes entre des facteurs internes de la plante et des facteurs environnementaux qui aboutissent à l'induction de l'expression de gènes impliqués spécifiquement dans le processus de maturation. Ainsi, il a été démontré qu'une altération de l'expression de certains gènes impliqués dans des voies de signalisation dépendantes de ces facteurs engendre des modifications métaboliques dans le fruit affectant ses qualités sensorielles et notamment sa couleur, sa texture et sa saveur (Ayub *et al.* 1996).



➤ *Les effets pléiotropes associés aux facteurs hormonaux et environnementaux*

La plupart des facteurs connus pour être impliqués dans la mise en place et le déroulement du processus de maturation du fruit, comme l'éthylène, l'auxine ou la lumière, régulent également d'autres processus au cours des différents stades du développement et dans les différents tissus de la plante. Par exemple, l'éthylène qui est l'hormone clé de la maturation du fruit, est impliquée dans nombreux autres processus au cours de la vie de la plante, entre autre, la résistance aux stress biotiques et abiotiques, la croissance des racines, la sénescence des organes, ou encore la germination. De même, la lumière qui contrôle l'accumulation des pigments pendant la maturation est également impliquée dans le développement des parties végétatives et la germination (Alba *et al.*, 2000). De ce fait, des modifications affectant la perception de ces signaux ou les voies de signalisation cellulaires qui en découlent, peuvent engendrer des effets pléiotropes gênants pour la caractérisation fonctionnelle de gènes cibles. Ainsi, de nombreux travaux concernant la caractérisation fonctionnelle de gènes de réponse à ces facteurs par des stratégies gain ou perte-de-fonction, ont permis de mettre en évidence de tels effets pléiotropes. Dans le cas des gènes de réponse à l'auxine et notamment le gène *IAA9* de tomate, un facteur de transcription de la famille des AUX/IAA (Auxin/Indole-3-Acetic Acid), des travaux ont montré qu'une baisse du niveau d'expression engendre de multiples perturbations tant morphologiques que développementales (Wang *et al.*, 2005). Ceux-ci se traduisent au niveau phénotypique, entre autre, par une altération de la morphogenèse des feuilles, de l'architecture vasculaire, des perturbations au cours du développement du fruit (parthénocarpie) et une réduction de la dominance apicale. De même, des analyses de mutants affectés dans le mûrissement du fruit chez la tomate, ont permis l'identification de mutations pléiotropes associées à la réponse à l'éthylène. C'est le cas des mutants de tomate *green-ripe* et *never-ripe2* qui présentent une altération du processus de maturation consécutive à une insensibilité à l'éthylène. En effet, ces mutants de maturation présentent des perturbations dans les processus de sénescence et d'abscission des fleurs et dans les phénomènes d'élongation racinaire (Barry *et al.*, 2005). Certains mutants de la voie de signalisation de l'éthylène caractérisés dans différentes espèces végétales, majoritairement chez *Arabidopsis*, présentent également des altérations multiples du développement. A titre d'exemple, une diminution de l'expression du gène *ETR1* (ETHylene Responsive1), codant un récepteur de l'éthylène, provoque une diminution de la capacité de germination des graines, une réduction de la sénescence des feuilles et au niveau moléculaire, engendre une diminution significative du taux d'expression de nombreux gènes de réponse à l'éthylène (Chang *et al.*, 1993). En ce qui concerne le dialogue hormonal, des

études ont montré que l'éthylène intervient dans la régulation des taux d'accumulation de plusieurs hormones mais aussi dans leur perception par la cellule (Gazzarrini et Mc Court, 2003). Par exemple, les mutants *etr1* présentent une diminution de la sensibilité à l'acide abscissique (Ghassemian *et al.*, 2000). Les régulations croisées entre les différentes hormones contrôlant les processus développementaux dans la plante, forment des réseaux complexes qui accentuent les effets pléiotropes des mutations associées à la régulation hormonale.

➤ *Cas des familles multigéniques*

Un certain nombre de gènes impliqués dans la mise en place et le déroulement du processus de maturation appartiennent à des familles multigéniques conservées dont les membres présentent des profils d'expression distincts. Les protéines pour lesquels ils codent ont souvent un type d'activité similaire mais peuvent interagir avec des partenaires protéiques différents et intervenir dans des processus distincts. A titre d'exemple, chez la tomate les gènes codant les différentes isoformes d'ACC synthase sont différentiellement exprimés en fonction du stade de développement du fruit (Barry *et al.*, 2000). Ainsi *SLACS6* s'exprime uniquement dans le fruit vert, *SLACS4* au cours de la phase d'acquisition de la compétence à mûrir et *SLACS2* pendant la maturation. Pour la génétique fonctionnelle, l'utilisation en transgénèse de séquences codantes communes aux différents membres d'une famille multigénique peut conduire à l'inactivation de tous les membres de la famille par PTGS (*Post Transcriptional Gene Silencing*), alors que l'utilisation de séquences spécifiques, souvent non codantes, permet d'inactiver sélectivement un des membres. Cependant, dans le cas de familles à forte conservation de séquence, la sélectivité de la répression n'est pas toujours efficace conduisant à des phénomènes de co-répression affectant différents membres d'une même famille multigénique.

➤ *L'utilisation de promoteurs constitutifs en transgénèse*

Malgré les phénomènes de pléiotropie et de co-répression, dans la plupart des travaux visant à modifier l'expression d'un gène d'intérêt, l'expression du transgène est placée sous le contrôle du promoteur constitutif CaMV35S. Celui-ci assure un niveau d'expression élevé dans toutes les cellules de la plante (Odell *et al.*, 1985). Cependant, la présence ubiquitaire du transgène peut générer des effets pléiotropes et même conduire à la léthalité. A titre d'exemple, les lignées de tomate exprimant un transgène antisens du gène *ACS2* présentent une inhibition de 99,5% de la production d'éthylène ayant pour conséquence une absence totale de mûrissement du fruit (Oeller *et al.*, 1991). Par ailleurs, d'un point de vue sociétal et

règlementaire, il existe une demande très forte de limiter l'expression des transgènes aux parties utiles des plantes génétiquement modifiées mises sur le marché. Restreindre le champ d'action d'un transgène est un gage de sécurité accrue. Ainsi, l'utilisation de promoteurs permettant l'expression de transgènes dans toutes les parties de la plante hormis les tissus comestibles ou reproducteurs trouve ici tout son sens. D'un point de vue technologique, le défaut de contrôle de l'expression spatio-temporelle du transgène peut également conduire à des pertes d'efficacité. En effet, des analyses effectuées sur des plants de coton transgéniques surexprimant le gène *BT* (isolé à partir de *Bacillus Turengiensis*) leur conférant une résistance accrue contre le ver du coton, montrent que la teneur globale de la protéine insecticide diminue avant la fin du cycle végétatif. Par ailleurs, l'expression de la protéine reste faible dans l'ovaire qui est une cible privilégiée du pathogène (Kranthi, 2005). D'après ces constations, l'utilisation de promoteurs tissu-spécifiques permettant de restreindre et cibler l'expression d'un transgène présente donc un intérêt croissant, tant au niveau technologique que sociétal.

➤ *Intérêt des promoteurs fruit et maturation-spécifiques*

Dans le cas de l'étude de la maturation des fruits par des approches de transgénèse et en particulier, l'analyse fonctionnelle des gènes impliqués dans les différents processus associés à la qualité du fruit, il serait très utile de pouvoir cibler l'expression du transgène dans le fruit à un stade de développement défini. Une telle méthodologie passe par l'isolement, la caractérisation et l'utilisation de promoteurs de gènes dont l'expression est spécifiquement ou strictement induite dans le fruit et préférentiellement au cours de la maturation. Ces promoteurs, à l'état natif, peuvent être utilisés pour diriger l'expression de gènes d'intérêt. Des exemples de travaux concernant la caractérisation et l'utilisation de ces promoteurs seront développés dans le paragraphe 1-2 de ce chapitre. Une alternative plus spécifique, impliquerait la construction d'un promoteur synthétique conférant cette même spécificité d'expression. Ce type de promoteur synthétique tissu-spécifique nous permettrait de disposer d'un puissant outil pour cibler l'expression d'un transgène. Par ailleurs, sur un plan fondamental, la caractérisation de nouveaux promoteurs apporterait des éléments de réponse pour la compréhension des modalités du contrôle de la transcription dans le fruit et au cours de la maturation. En effet, celles-ci sont mal connues du fait de la multiplicité des phénomènes mis en jeu. La caractérisation de promoteurs fruit-spécifiques passe par l'identification d'éléments *cis*-régulateurs présents dans les séquences promotrices de gènes dont l'expression est fruit-spécifique et qui seraient impliqués dans la régulation spatio-

temporelle de l'expression. Dans cette optique, il est tout d'abord nécessaire d'identifier des gènes s'exprimant spécifiquement ou préférentiellement dans le fruit grâce à des analyses de leur profil d'expression.

1-1 Méthodes d'identification de gènes à partir de leur profil d'expression

Différentes techniques visant à l'identification de gènes à partir de leur profil d'expression sont développées et permettent de sélectionner des gènes candidats dont l'expression est associée à un tissu, un processus ou un métabolisme d'intérêt. Jusqu'à présent, le choix de tels gènes candidats était principalement réalisé sur la base d'analyses d'expression ciblées sur un gène ou une famille de gène en utilisant les techniques classiques de RT-PCR ou de Northern-blot. Depuis quelques années, un grand nombre de méthodologies ont été développées afin de quantifier l'abondance des transcrits dans les tissus végétaux. Car, bien que les techniques classiques et éprouvées de Northern blot et de PCR semi-quantitative et quantitative soient sensibles et spécifiques, elles ne sont pas adaptées pour des criblages systématiques. Ainsi les méthodologies à haut débit utilisées en génomique fonctionnelle se sont révélées très utiles à l'identification de gènes à partir de leur profil d'expression. Ces techniques à haut débit se caractérisent par des méthodes expérimentales combinées à des analyses statistiques et informatiques. La stratégie fondamentale est de pouvoir étendre le champ d'investigation de l'étude d'un seul gène ou protéine à l'étude de tous les gènes ou protéines d'un organisme de manière systématique (Hieter et Boguski, 1997). Largement répandue dans le cas des espèces modèles, les approches à haut débit font dorénavant leur apparition pour étudier les espèces d'intérêt agronomique et en particuliers, les fruits. Dans ce paragraphe seront développées les méthodologies les plus courantes visant à l'identification de gènes à partir de leur profil d'expression. Il s'agit de l'utilisation des banques d'EST, du criblage différentiel de banque d'ADNc, des analyses de puces à ADN ou *microarrays* et du piégeage de promoteur.

1-1-1 Les analyses des banques d'EST

Les EST (Expressed Sequence Tag) sont des séquences générées automatiquement à partir de banques d'ADN complémentaires (ADNc), celles-ci contiennent des dizaines de milliers de clones représentant une photographie instantanée de l'expression des gènes dans un

tissu et dans une condition physiologique précise. Trois espèces fruitières font l'objet d'un séquençage massif (tableau II-1), la vigne (plus de 312 000 EST), la tomate (plus de 249 000 EST) et la pomme (plus de 249 000 EST). Afin d'identifier, *in silico*, des gènes en fonction de leur profil d'expression, il est possible d'interroger des bases de données d'expression d'EST. Pour la tomate, la collection d'EST non redondante de plus de 27 000 unigènes est consultable sur deux bases de données (Solanaceae Genomic Network : SGN et The Institute for Genomic Research : TIGR).

Espèce	EST	GSS	Core Nucleotide	Protéines	Taille du génome (Mb)	n
<i>Oryza sativa</i> (riz)	1188992	253150	187329	153190	390	12
<i>Zea mays</i> (maïs)	1143830	2017441	93797	8930	2400	10
<i>Triticum aestivum</i> (blé)	854015	7999	6257	3643	16000	21
<i>Arabidopsis thaliana</i> (arabette)	622972	440439	165696	124636	120	5
<i>Glycine max</i> (soja)	359158	100064	4848	2861	1200	20
<i>Vitis vinifera</i> (vigne)	316756	109147	1309	931	500	19
<i>Malus x domestica</i> (pomme)	253992	19	1181	989	750	17
<i>Medicago truncatula</i> (luzerne)	225129	168809	3533	19295	500	8
<i>Solanum tuberosum</i> (pomme de terre)	219917	1211	3142	2969	840	12
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	258448	320398	5707	2848	950	12

Tableau II-1: Données de séquences de dix espèces végétales classées par nombre d'EST identifiées. Dans ce tableau sont également listés le nombre de séquences génomiques, et protéiques disponibles dans la base de données GenBank au 5/11/2007. La taille des génomes correspondants est exprimée en Méga base (Mb) et le nombre de chromosomes (n) est listé dans la dernière colonne. Source: www.ncbi.nlm.nih.gov.

1-1-2 Les techniques de criblage différentiel

Les techniques de criblage différentiel permettent de déterminer les gènes spécifiquement exprimés dans un tissu ou un ensemble de tissus par rapport à un autre. Le **Differential display** (Liang et Pardee, 1992) utilise une amplification par PCR peu stringente et avec des amorces aléatoires et des oligo-dT pour amplifier des populations d'ADNc. Cependant cette technique est peu quantitative et engendre une fraction importante de faux positifs. Cette technique a été utilisée chez la tomate pour mettre en évidence les gènes régulés par l'éthylène (Zegzouti *et al.*, 1999) (tableau II-2) ou au cours du développement du fruit (Jones *et al.*, 2002). La technique **cDNA AFLP** (Bachem *et al.*, 1996) est une amélioration du *differential display* par adaptation de l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) utilisée en génétique pour l'identification de nouveaux marqueurs moléculaires. La technique cDNA AFLP nécessite la ligation d'adaptateurs sur des fragments

d'ADNc. Ces adaptateurs sont utilisés comme site d'amorçage pour la PCR afin de mettre en évidence une amplification différentielle de bandes de taille donnée. Cette technique a été, par exemple, utilisée chez la fraise pour identifier des gènes régulés pendant le développement (Martelli *et al.*, 2003).

<i>Clone</i>	<i>Sequence homology</i>		<i>ethylene</i>
<i>Signal transduction components</i>			
ER43	small GTP -binding prot.	(<i>Pea</i>)	+
ER50	CTR1 like kinase	(<i>Tomato</i>)	+
ER66	Ca ²⁺ /Calmo. Binding protein	(<i>A. th.</i>)	+
DR13	Pti4	(<i>Tomato</i>)	+
DR14	SNF1	(<i>Potato</i>)	+
DR15	S/T Kinase	(<i>Sorghum</i>)	0
DR16	Ca ²⁺ /Calmo. Depend. Kinase	(<i>Maize</i>)	+
DR17	Ca ²⁺ /Calmo. Depend. Kinase	(<i>Tradescantia</i>)	+
DR18	PK12	(<i>Tobacco</i>)	0
<i>Transcription factors</i>			
ER24	Transcrip. coactivator MBF1	(<i>Silk worm</i>)	+
DR3	Aux -IAA3	(<i>Tomato</i>)	+
DR4	Aux -IAA4	(<i>Tomato</i>)	-
DR12	Auxin Resp. Factor 1 (ARF1)	(<i>Arabidopsis</i>)	-
DR8	Aux -IAA8	(<i>Tomato</i>)	-
ER10	ERF2	(<i>Tobacco</i>)	+
ER11	ERF4	(<i>Tobacco</i>)	+
<i>Post-transcriptional regulation</i>			
ER49	Elongation factor EF -Ts	(<i>T. thermophilus</i>)	+
ER68	RNA helicase DBP2	(<i>S. cerevisiae</i>)	+

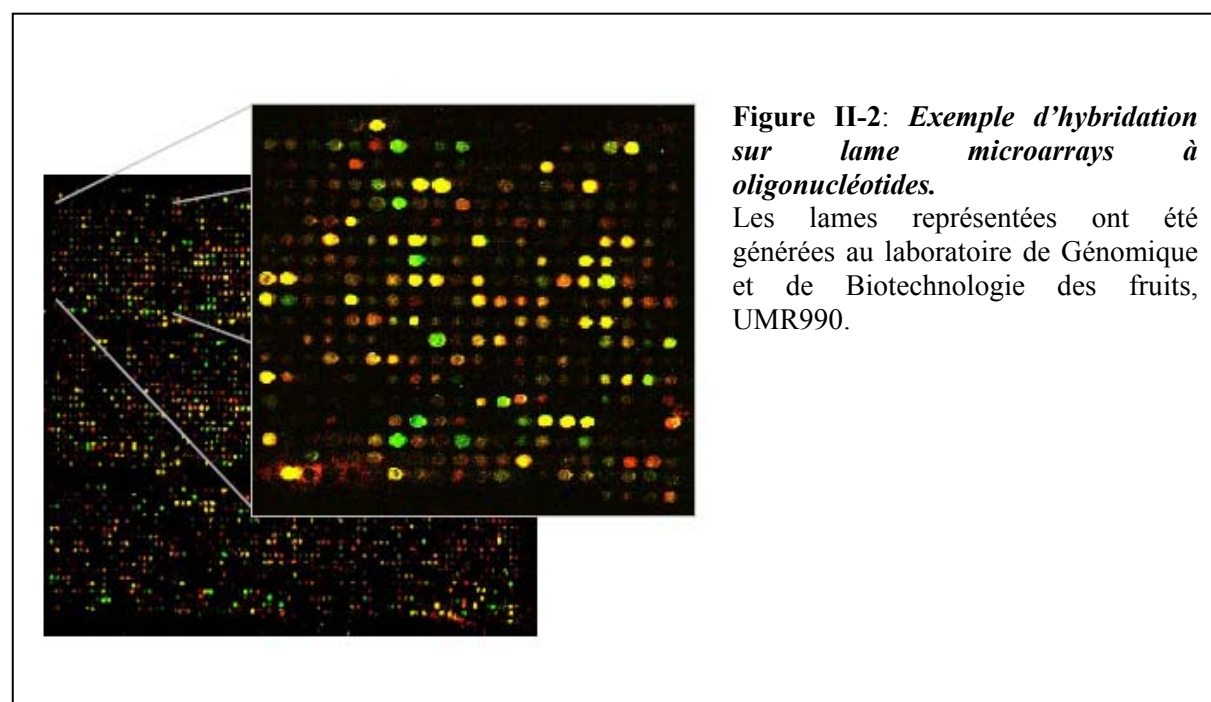
Tableau II-2: Liste des gènes de réponse à l'éthylène identifiés par « differential display » chez la tomate. Les clones ER (Éthylène Responsive) identifiés ici, sont classés en fonction des mécanismes de régulation dans lesquels ils sont potentiellement impliqués. Des analyses de séquence ont permis de déterminer une fonction putative pour chacun de ces gènes à partir d'homologie de séquence avec des protéines connues. D'après Zegzouti *et al.*, 1999.

La technique du SSH : *Subtractive Suppressive Hybridization* (Diatchenko *et al.*, 1996) permet d'identifier les gènes différentiellement exprimés entre deux tissus en éliminant, par hybridation soustractive, les transcrits communs. En théorie, la méthodologie SSH permet de mettre en évidence des transcrits faiblement exprimés. Chez les plantes, il a principalement été utilisé pour les études d'interaction hôte / pathogène comme chez le cacao (Verica *et al.*, 2004). L'analyse en série de l'expression des gènes SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) est une technique ingénieuse, réduisant chaque gène exprimé à une information minimum, un tag d'une quinzaine de nucléotides. C'est une technique exhaustive qui combine le *Differential display* et le séquençage d'ADNc (Velculescu *et al.*, 1995). Elle présente l'avantage d'être quantitative. Cependant cette technique est laborieuse et nécessite une bonne

connaissance préalable du génome, ce qui a empêché sa généralisation. A ce jour, cette technique n'a pas encore été utilisée chez les fruits.

1-1-3 Les analyses microarrays

Les *microarrays* (Schena *et al.*, 1995) tirent l'avantage des collections existantes d'EST et de séquences génomiques, pour comparer simultanément l'expression des gènes dans deux populations d'ARN d'origines différentes. Les lames de *microarray* sont composées d'une collection de séquences d'ADN (produits PCR, ADNc ou oligonucléotides), cataloguées et déposées sur une lame (figure II-2). Les progrès technologiques effectués en termes de miniaturisation permettent d'étudier l'ensemble du transcriptome d'un organisme sur des surfaces de quelques centimètres carrés, contrairement aux *macroarrays* de plus faible densité. Plus de treize milles séquences non redondantes de tomate ont été déposées sur des lames *microarrays* (Université de Cornell et Laboratoire GBF UMR990), ces outils permettent ainsi l'analyse du transcriptome en donnant l'abondance relative des transcrits en fonction des tissus analysés.



1-1-4 La capture de gènes

La stratégie de capture de gènes est basée sur l'utilisation de transgènes contenant un gène rapporteur qui seront insérés au hasard dans le génome. Cette stratégie peut être utilisée afin d'obtenir des informations fonctionnelles sur la région d'insertion notamment du point de

vue de son activité transcriptionnelle, c'est le but de la stratégie de piégage de promoteurs ou « *promoter trap* » qui permet d'identifier des régions promotrices à partir de leur spécificité d'expression (Pereira, 2000). Cette stratégie consiste à produire des lignées d'insertions en utilisant des constructions dépourvues de promoteur et contenant un marqueur de capture, souvent le gène rapporteur GUS (β -glucuronidase) ou GFP (*Green Fluorescent Protein*). Lors de l'insertion de l'élément, il peut y avoir, sous certaines conditions d'insertion et d'orientation, production d'une fusion de gène où le gène rapporteur va s'exprimer sous le contrôle des régions régulatrices du site d'insertion. L'identification de régions du génome impliquées dans des régulations très spécifiques, par exemple dans un tissu donné ou en réponse à un facteur particulier pourra être entreprise à partir de l'analyse de ces lignées. Ces techniques ont été utilisées avec succès pour identifier des gènes exprimés spécifiquement au cours du développement embryonnaire chez *Arabidopsis* par exemple (Topping et Lindsey, 2000). Dans le cas la tomate, une approche par *Transposon tagging* a été développée par Meissner et collaborateurs (2000).

1-2 Promoteur fruits-spécifiques connus et leur utilisation pour diriger l'expression de gènes d'intérêt

1-2-1 Principales acquisitions sur les promoteurs fruit-spécifiques

La littérature montre que les différentes approches décrites précédemment ont permis d'identifier différents promoteurs de gènes dont l'expression est spécifiquement induite dans ciblée dans le fruit et/ou pendant la maturation. Ainsi, chez la tomate plusieurs promoteurs fruit-spécifiques ont été isolés et caractérisés tels que le promoteur de *2A11* (Van Haaren et Houck, 1991), le promoteur de l'*ACO1* (Blume *et al.*, 1997 ; Blume et Grierson, 1997), le promoteur E8 (Deikman *et al.*, 1992), le promoteur E4 (Montgomery *et al.*, 1993) et le promoteur de la polygalacturonase (Nicholass *et al.*, 1995). Des gènes spécifiquement régulés dans le fruit et au cours de la maturation ont également été décrits dans la littérature. Parmi ces gènes figurent entre autres, *TomLoxC* codant une lipoxygénase (Griffiths *et al.*, 1999), celui codant l'invertase vacuolaire (Elliott *et al.*, 1993), certains gènes de la famille des *ACS* (Barry *et al.*, 2000) et *ADH2* codant une alcool deshydrogénase (Longhurst *et al.*, 1994). L'ensemble de ces gènes dont le profil d'expression est corrélé avec le déclenchement du

processus de maturation sont représentés dans la figure II-3. Parmi les gènes fruit-spécifiques identifiés chez la tomate, *2A11*, *E8*, *E4* et celui codant la polygalacturonase ont pu être plus largement décrits.

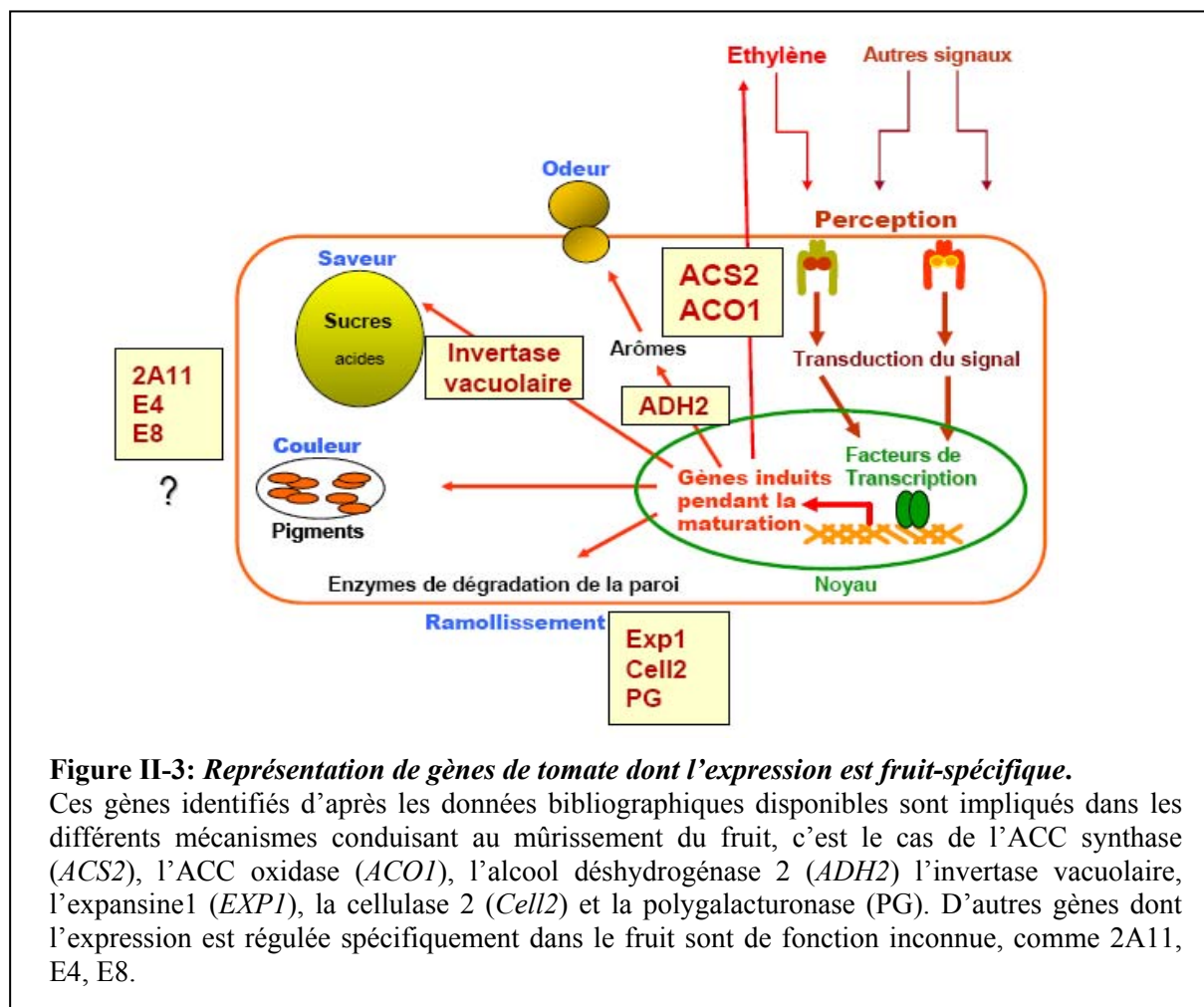


Figure II-3: Représentation de gènes de tomate dont l'expression est fruit-spécifique.

Ces gènes identifiés d'après les données bibliographiques disponibles sont impliqués dans les différents mécanismes conduisant au mûrissement du fruit, c'est le cas de l'ACC synthase (*ACS2*), l'ACC oxydase (*ACO1*), l'alcool déshydrogénase 2 (*ADH2*), l'invertase vacuolaire, l'expansine1 (*EXP1*), la cellulase 2 (*Cell2*) et la polygalacturonase (PG). D'autres gènes dont l'expression est régulée spécifiquement dans le fruit sont de fonction inconnue, comme *2A11*, *E4*, *E8*.

Le gène *2A11* qui est de fonction inconnue est exprimé de façon strictement fruit-spécifique (Pear *et al.*, 1989). Ainsi, les ARNm correspondants commencent à s'accumuler dans les ovaires et s'accumulent fortement pendant la maturation. Des expériences de délétions ont montré que son expression est contrôlée au niveau spatio-temporel par des éléments régulateurs positifs et négatifs qui n'ont aucune similarité de séquence avec d'autres promoteurs de gènes de maturation ou de réponse à l'éthylène (Van Haaren et Houck, 1991). Des études par gel retard ont montré l'existence d'au moins 4 domaines de liaison de protéines conférant sa spécificité d'expression dans le fruit (Van Haaren et Houck, 1993). Ce promoteur est considéré comme l'un des plus actifs pour diriger l'expression de transgènes dans le fruit de tomate.

Le gène *E8* s'exprime fortement au début de la maturation du fruit de tomate ; il ne s'exprime pas dans les feuilles, racines ou tiges et il est positivement régulé par l'éthylène (Lincoln *et al.*, 1987; Lincoln et Fischer, 1988). Un facteur de transcription capable d'interagir spécifiquement avec la séquence promotrice de *E8* dont l'activité de liaison augmente pendant la maturation a été identifié (Deikman et Fischer, 1998). Ce facteur est également capable de se lier au promoteur d'un autre gène de réponse à l'éthylène, *E4*.

Le gène *E4* s'exprime très fortement dans le fruit sous l'action de l'éthylène, mais il s'exprime également dans les feuilles (Lincoln et Fischer, 1988). Il a été montré qu'une région du promoteur située entre les nucléotides -161 et -85 confère la capacité de réponse à l'éthylène (Montgomery *et al.*, 1993), mais aucun élément régulateur impliqué dans une spécificité d'expression tissulaire n'a été caractérisé.

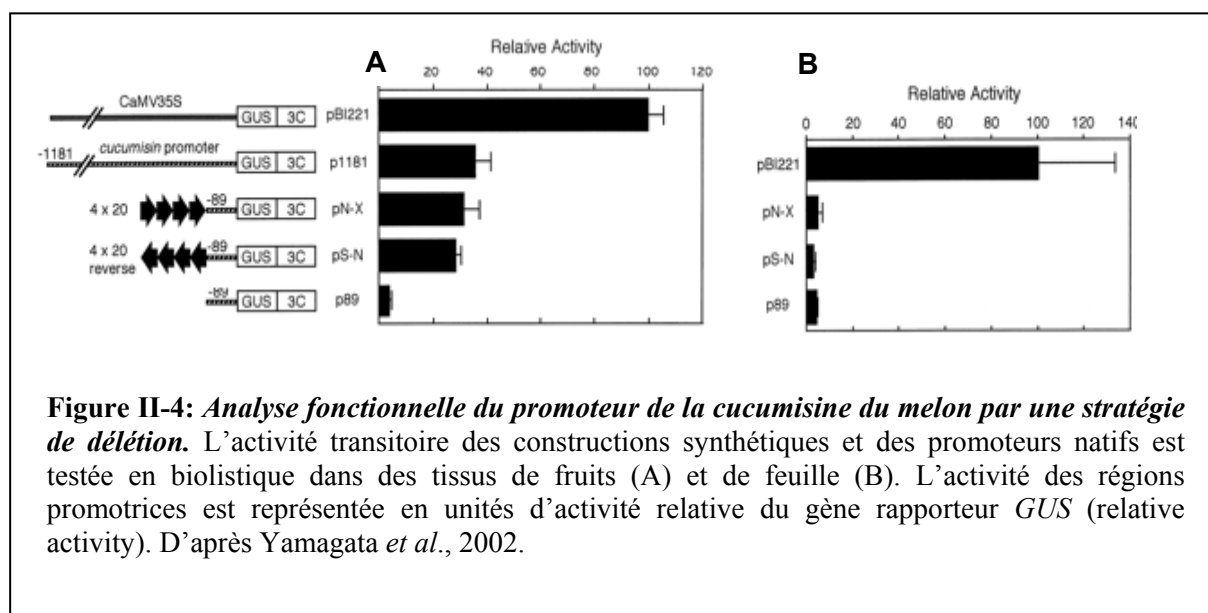
La polygalacturonase (PG) est une enzyme majeure de la dégradation de la paroi cellulaire qui est codée par un gène en copie unique chez la tomate. Le promoteur de ce gène a été isolé et caractérisé. Il a été démontré qu'une séquence de 1.4 kb du promoteur était capable de diriger l'expression du gène rapporteur CAT (Chloramphenicol acyltransferase) de façon fruit-spécifique, mais à un faible niveau d'expression (Bird *et al.*, 1988). En fait cette séquence comporte un élément régulateur positif entre les nucléotides -231 et -134 responsable du faible niveau d'expression dans le péricarpe externe, les 134 pb proximales étant insuffisantes pour diriger l'expression génique (Montgomery *et al.*, 1993). Un autre élément régulateur positif a été trouvé entre les positions -806 et -443, il est capable de conférer à lui seul un fort niveau d'expression et au niveau spatial, d'étendre cette expression dans le péricarpe externe et interne. Un élément régulateur négatif a été découvert entre les nucléotides -1411 et -1150, celui-ci permet de restreindre l'expression à la partie externe du péricarpe et cause une réduction du niveau global d'expression génique (Montgomery *et al.*, 1993). En étendant la séquence à 4,8 kpb, Nicholass *et al.*, (1995) ont montré un accroissement considérable de l'expression génique fruit-spécifique et détecté des séquences répétées imparfaites de 400 pb qui présentent des similarités avec les promoteurs des gènes *E4* et *E8*. Des séquences de 1460 et 532 pb du promoteur de PG de pomme ont montré une capacité à diriger l'expression du gène GUS de façon maturation-spécifique dans la tomate (Atkinson *et al.*, 1998). Il en est de même pour des fragments de 1966 pb et 1159 pb du promoteur de l'ACC oxydase de pomme qui ont permis de diriger l'expression du gène rapporteur GUS d'une façon à la fois fruit et maturation spécifique (Atkinson *et al.*, 1998).

1-2-2 Applications biotechnologiques des promoteurs fruit-spécifiques

Sur le plan des applications biotechnologiques, plusieurs travaux illustrent la possibilité d'utiliser ces promoteurs pour diriger l'expression de gènes d'intérêt dans les fruits. Ainsi, le promoteur de la polygalacturonase de tomate a été utilisé pour réprimer ou sur-exprimer une alcool deshydrogénase de façon spécifique dans le fruit de tomate (Speirs *et al.*, 1998). Il en a résulté une modification significative de la balance entre certains alcools et aldéhydes contribuant à l'arôme du fruit. Le même promoteur a été utilisé pour surexprimer une phytoène synthase bactérienne dans les fruits de tomate (Fraser *et al.*, 2002). Ceci a conduit à une très forte stimulation de la synthèse de caroténoïdes démontrant ainsi l'efficacité et la potentialité du promoteur. De même, le promoteur 2A11 a été mis en œuvre pour inhiber l'expression d'une sucrose synthase dans le fruit de tomate via un ADNc antisens (Chengappa *et al.*, 1999). Des applications récentes dans le domaine des biotechnologies à visée médicale montrent que l'utilisation de promoteurs fruit-spécifiques en transgénèse, présente un intérêt majeur. Ces travaux qui consistent à produire dans des plantes transgéniques des antigènes destinés à la vaccination orale, se sont focalisés sur une espèce comestible et répandue, la tomate. Une telle technologie offrirait un nouveau mode d'administration de vaccins, par la consommation de fruits produisant des antigènes spécifiques. Dans cet optique, des tomates produisant une sous-unité de la toxine cholérique ont été générées (Jani *et al.*, 2002). Plus récemment, plusieurs publications décrivent l'utilisation de promoteur fruit-spécifiques natifs pour diriger l'expression de protéines immunogènes, le promoteur E8 pour diriger l'expression d'une protéine cholérique (He *et al.*, 2007) puis de protéines du virus HIV (Ramirez *et al.*, 2007) et le promoteur 2A11 pour diriger l'expression de protéines de surface du virus de l'hépatite B (Lou *et al.*, 2007). Les résultats décrits montrent une réelle potentialité de ces promoteurs dans ce type d'applications.

Il existe cependant des cas où l'utilisation de promoteurs fruit-spécifiques ne donne pas les résultats significatifs espérés. Ainsi, l'utilisation du promoteur du gène E8 pour diriger l'expression d'une sucrose synthase chez la tomate n'a entraîné aucun effet sur l'accumulation de sucre dans le fruit en raison de la faible sur-expression du transgène et sans doute également en raison du fait que les sucres s'accumulent préférentiellement avant la maturation à un moment où le promoteur E8 est peu actif (Powell et Bennett, 2002). Ce type de situation est sans doute plus fréquent que ne l'indique la littérature car des résultats négatifs consécutifs à l'utilisation d'un promoteur ne sont sans doute pas publiés. Il existe donc un besoin de définir de nouveaux promoteurs fruit- ou maturation-spécifiques assurant un niveau de transcription élevé du transgène tout en ciblant l'expression au niveau spatio-

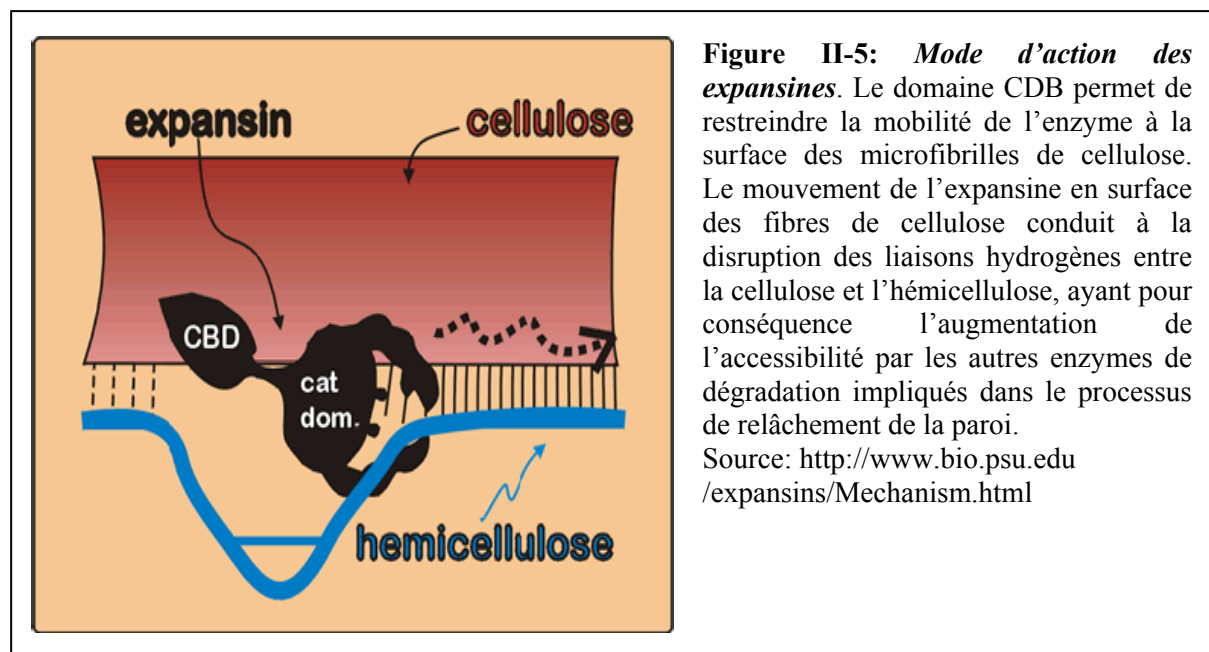
temporel. De plus l'utilisation de promoteurs natifs, ne permet pas de s'affranchir de régulations indépendantes du fruit. En effet, les promoteurs présentent de nombreuses séquences *cis*-régulatrices, elles mêmes reconnues par une multitude de facteurs de transcription spécifiques régulés par un jeu complexe de voies de signalisation cellulaires. Ainsi il semble particulièrement intéressant d'utiliser des promoteurs synthétiques présentant de courtes séquences promotrices répétées. Ainsi chez le melon, l'étude fonctionnelle du promoteur du gène codant la cucumisine, qui est exprimé de façon fruit-spécifique a permis l'identification d'un élément *cis*-régulateur conférant cette spécificité (Yamagata *et al.*, 2002). Ce *cis*-élément utilisé en association avec à un promoteur minimum permet d'activer spécifiquement l'expression d'un gène rapporteur dans des tissus de fruit par une méthode transitoire (figure II-4).



Pour répondre à la problématique de la thèse, notre travail s'est focalisé sur la caractérisation de promoteurs de deux gènes s'exprimant de façon fruit-spécifique, l'un codant une expansine, l'autre une alcool acyl-transférase. Ces gènes vont faire l'objet des deux paragraphes suivants.

1-3 L'expansine1 de tomate

Les expansines sont des protéines pariétales impliquées dans le relâchement de la paroi. Elles ont été purifiées pour la première fois dans les tissus végétatifs où leur rôle dans la croissance a été démontrée (McQueen-Mason *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993; Keller et Cosgrove, 1995). Les expansines n'ont pas d'activité hydrolytique et leur mécanisme d'action n'est pour l'instant pas connu avec précision. Cependant, leur capacité à rompre les liaisons non covalentes (liaisons hydrogène) entre les filaments de cellulose et d'hémicellulose a été démontrée *in vitro* (figure II-5). Cette rupture des liaisons hydrogènes permet d'augmenter l'accessibilité des microfibrilles aux autres enzymes pariétales (McQueen-Mason et Cosgrove, 1994 et Powell *et al.*, 2003).



Les expansines appartiennent à des familles multigéniques, ainsi on dénombre actuellement, 26 gènes codant des alpha-expansines chez *Arabidopsis* et 12 chez la tomate. Certaines expansines interviennent dans la relaxation des parois végétales et en particulier dans le ramollissement du fruit pendant la maturation. En effet, l'expansine a été proposée comme étant potentiellement impliquée dans la perte de fermeté du fruit chez la tomate (Rose *et al.*, 1997 ; Brummell *et al.*, 1999, Powell 2003), la pêche (Hayama *et al.*, 2006), la fraise (Dotto *et al.*, 2006) et le melon (Nishiyama *et al.*, 2007). Par exemple, une sur-expression du gène codant l'expansine1 de tomate (*SlExp1*) engendre un ramollissement du fruit dès le

début du processus de maturation et à l'inverse une répression provoque une augmentation de la fermeté (Brummel *et al.*, 2001).

Le gène *SLEXP1* code une protéine qui est spécifiquement exprimée pendant la maturation. Par northern Blot, il a été montré que *SLEXP1* n'est pas exprimé dans les racines, les hypocotyles, la tiges et les jeunes feuilles (Rose *et al.*, 1997b, Brummel *et al.*, 1999; Rose *et al.*, 2000). Les transcrits de *SLEXP1* sont détectés en premier lieu au stade « breaker » de la maturation. Leur abondance augmente considérablement au stade « tournant » et reste élevée tout au long de la maturation. L'expression de *SLEXP1* est régulée par l'éthylène et les transcrits sont absents dans les mutants de maturation *rin* et *nor* (Rose *et al.*, 1997). C'est en raison de son profil que *SLEXP1* a été retenu comme candidat pour la caractérisation de promoteurs fruit-spécifiques. Un fragment de 1340 pb en amont de la séquence codante de ce gène a été précédemment isolé (Hoebericht, 2002). Ces travaux, concernent également la caractérisation fonctionnelle de cette séquence promotrice par délétion et analyse par transformation transitoire. Ainsi, il a été montré que la délétion de 161 pb du côté 5' de cette séquence induit une diminution significative du taux de transcrit dans le fruit et une augmentation dans la feuille. Suggérant la présence dans cette région, du promoteur d'un ou de plusieurs éléments régulateurs positifs de l'expression dans le fruit, au cours de la maturation et des éléments régulateurs négatifs de l'expression dans la feuille.

1-4 L' alcool acyl transférase1 de tomate

Les alcools acyl transférases (AAT) catalysent le transfert d'un acyl-CoA à un alcool (figure II-6). Elles correspondent à une très grande famille de gènes (environ 70 chez *Arabidopsis*) impliqués dans la formation de nombreux composés volatils (Pichersky and Gang, 2000). Chez les fruits et les fleurs, certains membres de cette famille sont impliqués dans la formation d'esters volatils responsables de l'émission d'arômes. Un certain nombre de gènes codant des AAT ont été isolés et caractérisés chez les fruits et les fleurs (Fleur : Dudareva *et al.*, 1998, Shalit *et al.*, 2001, D'Auria *et al.*, 2002; fraise : Aharoni *et al.*, 2000; Beekwilder *et al.*, 2004; pomme : Souleyre *et al.*, 2005; raisin, Wang *et al.*, 2005, melon : El-Sharkawy *et al.*, 2005). Chez le melon, trois gènes codant des AAT (*Cm-AAT1*, *Cm-AAT3* and *Cm-AAT4*) ont été isolés. Ils sont exprimés spécifiquement dans le fruit au cours de la maturation et leur expression est fortement dépendante de l'éthylène. Elles présentent des

spécificités de substrat qui contribuent à la production d'un grand nombre d'esters chez le fruit de melon au cours de la maturation (El Sharkawy *et al.*, 2005). Parmi les trois AAT, Cm-AAT1 est celle qui a la plus grande capacité à produire des thio-ether esters (Lucchetta *et al.*, 2007) qui sont d'une importance sensorielle considérable chez le melon (Wyllie *et al.*, 2000). L'importance de la spécificité de substrat a été également soulignée chez la pomme (Souleyre *et al.*, 2005) et le raisin (Wang *et al.*, 2005). Bien que catalysant le même type de réaction, les AAT de différentes espèces peuvent avoir des séquences très divergentes. Par exemple l'AAT de fraise et l'AAT1 de melon ont seulement que 22% d'identité alors qu'elles ont les mêmes préférences de substrats (Aharoni *et al.*, 2000; Yahyaoui *et al.*, 2002). En raison de leur importance dans la formation d'arômes, les AAT ont été des cibles pour la transformation génétique. Chez le pétunia, la sur-expression de l'AAT de fraise n'a pas modifié le profil d'émission volatile des fleurs et des parties vertes de la plante mais la production d'esters a pu être fortement stimulée après apport d'alcool isoamylique (Beekwilder *et al.*, 2004). En raison de son expression fruit et maturation-spécifique chez le melon, l'AAT de tomate se présente donc comme un candidat intéressant pour l'étude de son promoteur.

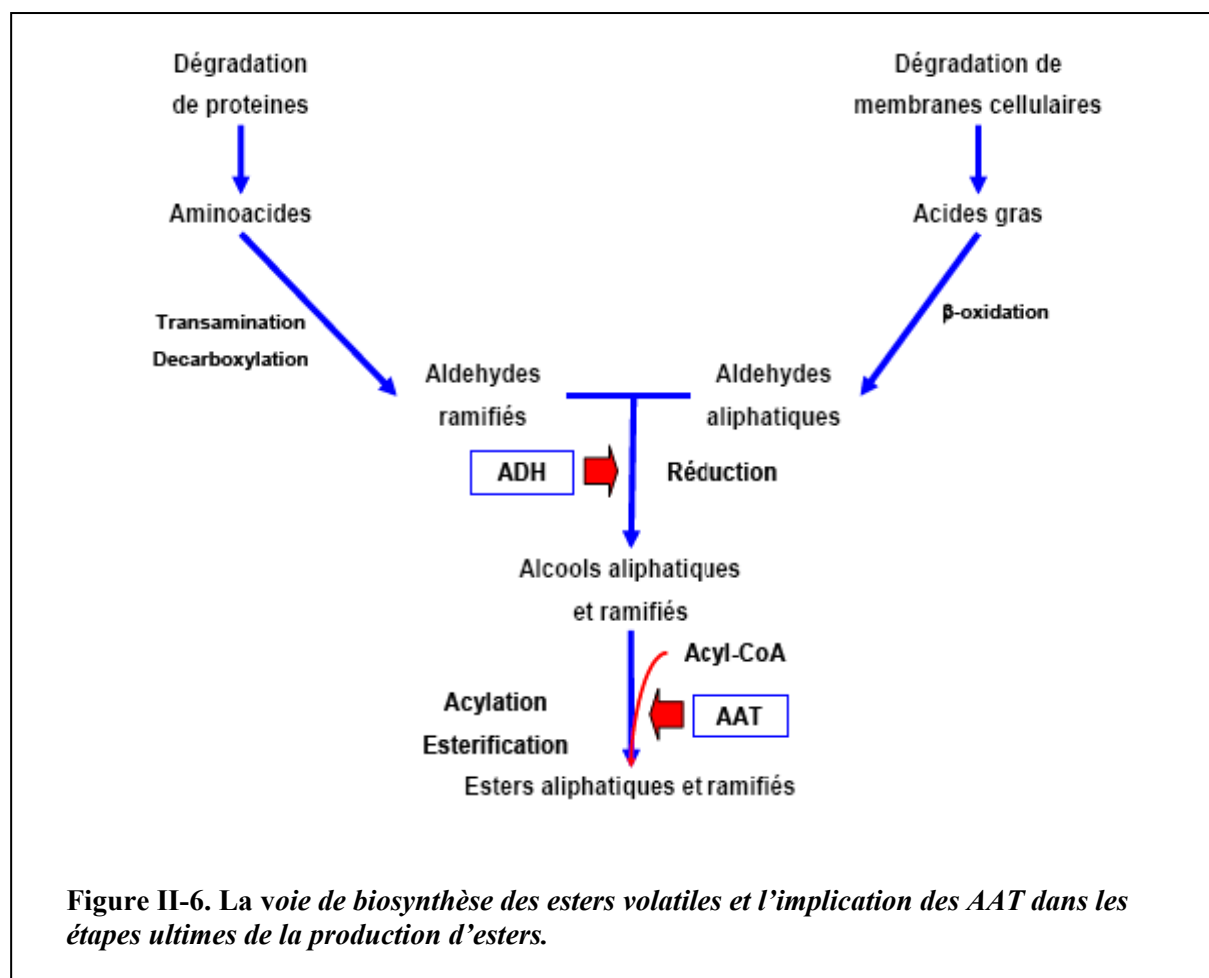


Figure II-6. La voie de biosynthèse des esters volatiles et l'implication des AAT dans les étapes ultimes de la production d'esters.

2-Matériel et méthodes

2-1 Matériel végétal

Des plants de tomate *Solanum lycopersicum* cv *MicroTom* et cv *Ailsa Craig* ont été cultivés en pots, dans les conditions suivantes : lumière 16 h à 28°C, obscurité 8 h à 25°C, humidité 80% et 250 mmol.m⁻².s⁻¹ d'intensité lumineuse. Pour les extractions d'ARN, les fruits ont été récoltés aux stades suivants : vert-immature (36 JAA), vert-mature (38 JAA), « breaker » (40 JAA), orange (45 JAA) et rouge (50 JAA). Les fruits, les fleurs, les feuilles, les racines et les tiges ont été congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à l'extraction d'ARN. Des plants d'*Arabidopsis thaliana* écotype *Wassilewskija* (WS) ont été cultivés en pots dans les conditions suivantes: lumière 14 h à 25°C, obscurité 10 h à 20°C, humidité 80% et 250 mmol.m².s⁻¹ d'intensité lumineuse.

2-2 Analyses de l'expression des gènes par RT-PCR

Extraction des ARNs totaux et synthèse d'ADNc

Le matériel végétal (fruit, feuille, fleur) est broyé dans de l'azote liquide. L'équivalent de 15 ml de poudre de tissus sont mélangés à 15 mL de tampon d'extraction 1% (P/V) d'acide tri-isopropyl naphtalène sulphonique, 6% (P/V) d'acide 4-amino salicylique, 5 g de phénol, 3,5 mL de m-crésol, 25 mg de 8-hydroxyquinolène et 7,5 mL d'eau) et 15 ml de phénol/chloroforme/ isoamylalcool (25:24:1). Après une centrifugation de 15 min à 5000 g, le surnageant est prélevé et les acides nucléiques sont précipités pendant une nuit à -20°C avec 0,1 vol d'acétate de sodium 3 M pH 4,5 et 1 vol d'isopropanol. Après une centrifugation de 30 min à 5000 g, le culot est lavé avec de l'éthanol 70%. Il est ensuite repris dans 4 mL d'eau stérile, 4 mL de tampon CTAB (2% CTAB, 100 mM Tris/HCl, pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 1.4 M NaCl) et 8mL de tampon de précipitation (1% CTAB, 50 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA pH8). Après une centrifugation de 45 min à 5000g à une température supérieure à 18°C, le culot est repris dans 2 mL d'eau stérile, 2 mL de tampon CTAB et 4 mL de tampon de précipitation. Après une centrifugation de 30 min, le culot est repris dans 2 mL de chlorure

de sodium 1,4 M et 2,5 vol d'éthanol absolu. Après une nuit de précipitation à -20°C et une centrifugation de 30 min, le culot est repris dans 400 µL d'eau UHQ stérile. L'élimination de l'ADN génomique est effectuée par une digestion à la DNase (Boehringer Mannheim) en présence de 1µL d'inhibiteur de RNase (RNasin, Promega) et 45 µL de tampon de DNase 10X (1 M acétate de sodium, 50 mM sulfate de magnésium, pH 5). Après une extraction au phénol/chloroforme/ isoamylalcool (25 :24 :1) et une extraction au chloroforme, les ARNs sont précipités pendant une nuit à -20°C avec 3 vol de éthanol 100% et 1/10 d'acétate de sodium. Après une centrifugation de 30 min à 14000 rpm, le culot est rincé avec 1 mL d'éthanol 70 %, puis dissout dans 70 µL d'eau UHQ stérile.

Amplification des transcrits par RT-PCR

A 5 µg d'ARN totaux sont ajoutés 200 pmol d'amorces polyT dans un volume réactionnel ajusté à 42 µL par de l'eau UHQ stérile traitée au DEPC. Les échantillons sont incubés 5 min à 65 °C puis immédiatement placés sur la glace. Aux 42 µL précédents sont ajoutés : 5 µL de tampon de réaction 5X, 1 µL de dNTP 10 mM, 1 µL de RNasin (Promega), 1 µL de MMLV-RT (Promega). Le milieu réactionnel est alors incubé 60 min à 42 °C puis la réaction est stoppée par une incubation de 5 min à 95°C. 1 µL de la précédente réaction a été utilisé pour chaque amplification PCR avec une unité de *Taq* polymérase (Promega) et 50 pmol de chaque amorce. Pour chaque réaction d'amplification deux couples d'amorces ont été utilisés, l'un est spécifique du gène et le second permet d'amplifier la séquence codante de l'ubiquitine de tomate utilisée comme témoin interne de l'amplification

Les amorces suivantes ont été utilisées :

AAT amorce sens: 5' CCACAAGCCAAAAGTAGTAGTTCC 3'
AAT amorce reverse: 5' GATCAATTCAACTGCATATGTCACCTG 3'
EXP1 amorce sens: 5' GGGTATCATAATTTTCATCCTTG 3'
EXP1 amorce reverse : 5' GAGGTAGAAGATCGATGGTC 3'
Ubiquitine amorce sens: 5' CTAACGGGGGAAGACGATCACCC 3'
Ubiquitine amorce reverse : 5' TCCCAAGGGTTGTCACATACATC 3'

Les amorces spécifiques de *SlEXP1* et *SlAAT* ont été déterminées à partir de leur séquence codante: *SlEXP1* (GenBank: AF443209) et *SlAAT* (GenBank: AY534531) puis ont été comparées à l'ensemble des séquences transcrites de la tomate disponibles (Solanaceae Genomic Network) pour vérifier l'absence d'homologie avec d'autres transcrits de tomate. Les produits PCR obtenus ont été analysés par dépôt et migration sur gel d'agarose 1,5% puis visualisés (BET/UV).

2-3 Isolement de séquences promotrices

Extraction d'ADN génomique

L'extraction d'ADN génomique a été réalisée selon la méthode décrite par Doyle et Doyle (2000) à partir de feuilles de tomate (Ailsa Craig) broyées dans l'azote liquide. Pour chaque extraction, un 1 g de la poudre obtenue est mélangé à 5 mL de tampon d'extraction (2% (P/V) CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8) et chauffé à 65°C pendant 10 mn. Après une extraction au phénol/chloroforme/isoamylalcool (25 :24 :1) et au chloroforme, l'ADN est précipité avec 1 vol d'isopropanol pendant 20 min dans la glace. Le culot, obtenu après centrifugation de 5 min à 2000 rpm, est repris dans 10 mL de tampon de lavage 76% (v/v éthanol, 10 mM acétate d'ammonium). Après centrifugation 10 min à 2000 rpm, l'ADN est dissous dans 200 µL d'eau stérile. Les ARN sont dégradés par traitement à la RNase (Sigma) pendant 10 min à 37 °C.

Isolement de fragments de promoteur par marche sur le chromosome

L'isolement du promoteur AAT a été réalisé à partir de la séquence codante de l'AAT de tomate (GenBank: AY534531), à l'aide du kit (BD Genome WalkerTM Universal Kit). La stratégie utilisée est décrite dans la figure II-7. Des banques de digestion (*EcoRV*, *DraI*, *HindIII*) ont été réalisées à partir de 3 µg d'ADN génomique (ADNg) de tomate, les ADNg digérés sont ligués à une cassette appelée adaptateur (BD Genome WalkerTM Adaptators). Puis, une première PCR est réalisée sur ces ADNg digérés avec un premier couple d'amorces :

-l'amorce AP₁ (5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3') qui s'hybride spécifiquement à l'adaptateur ;

-l'amorce AAT-R₁ (5' CCCTTGATCATCTATTTTCAGAAAGA 3') spécifique de la partie 5' de l'ARNm de l'AAT de tomate.

A partir de 1 µL de la première PCR, une deuxième PCR est réalisée, en utilisant un nouveau couple d'amorce :

-l'amorce AP₂ (5' ACTATAGGGGCACGCGTGGT 3') spécifique de l'adaptateur et situé en aval de la séquence reconnue par l'amorce AP₁ ;

- l'amorce AAT-R₂ (5' CACTTGATGGAAGTACTTTTGGCTTGTGG 3') spécifique de la séquence codante de l'AAT et située en amont de la séquence reconnue par AAT-R₁ (figure II-7).

Deux amplifications ont été obtenues à l'issue de la seconde PCR, il s'agit d'une amplification de 1990 pb pour la banque *EcoRV* et de 350 pb pour la banque *DraI*. Ces fragments ont été clonés dans vecteur pGemT Easy (Promega) puis séquencés. D'après l'analyse des séquences et la présence d'un site de restriction *DraI* dans la séquence de 1990 pb, les deux amplifications obtenues correspondent à la même séquence génomique. Des amplifications PCR sur de l'ADNg non digéré avec des amorces déterminées à partir de la séquence de 1990 pb ont permis de confirmer qu'il s'agit bien de la région promotrice de l'AAT de tomate.

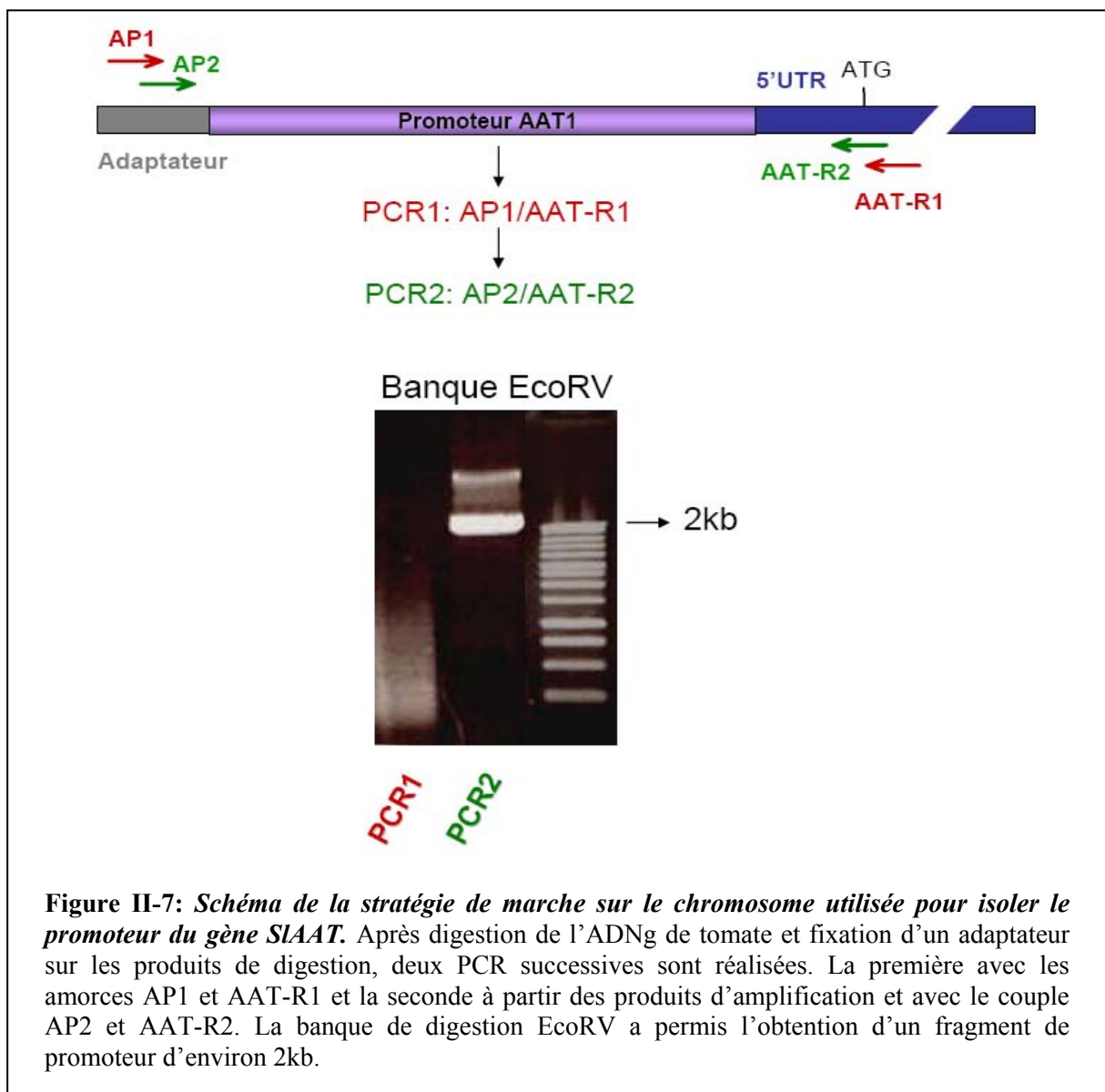


Figure II-7: Schéma de la stratégie de marche sur le chromosome utilisée pour isoler le promoteur du gène *SLAAT*. Après digestion de l'ADNg de tomate et fixation d'un adaptateur sur les produits de digestion, deux PCR successives sont réalisées. La première avec les amorces AP1 et AAT-R1 et la seconde à partir des produits d'amplification et avec le couple AP2 et AAT-R2. La banque de digestion *EcoRV* a permis l'obtention d'un fragment de promoteur d'environ 2kb.

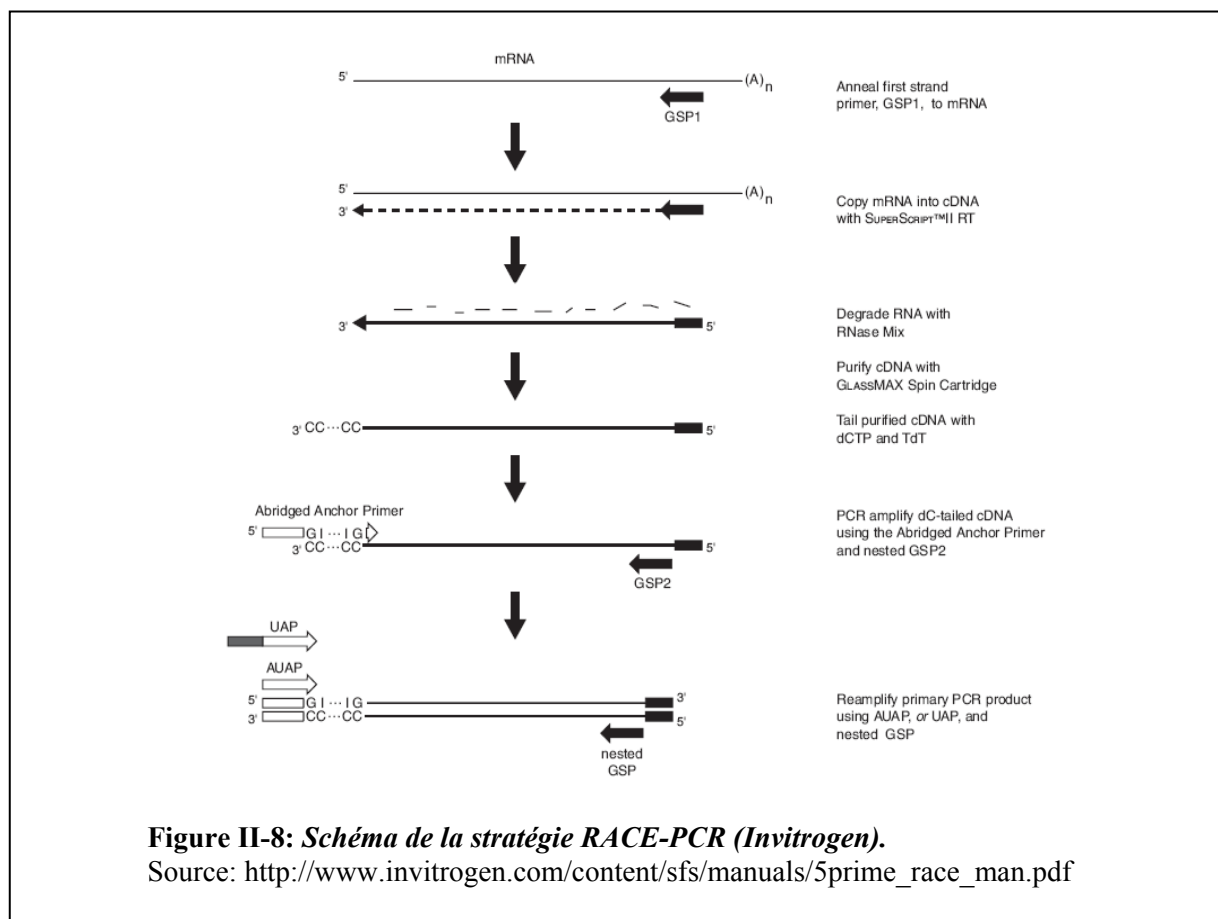
2-4 Analyses des séquences promotrices

Analyses in silico

L'identification des *cis*-éléments dans les séquences promotrices a été réalisée en consultant les bases de données PLACE (serveur www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE) et PlantCARE (serveur www.bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare). Les banques d'EST ont été consultées sur le serveur Sol Genomic Network (SGN) (<http://www.sgn.cornell.edu>) en utilisant le programme BLASTN. Les données *microarrays* de tomate ont été consultées sur le serveur Tomato Expression Database (TED) (<http://ted.bti.cornell.edu>).

Identification des régions transcrites par RACE-PCR

Une stratégie de RACE-PCR (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) a été appliquée à partir d'ARN de fruit de tomate stade orange afin d'isoler la totalité de la séquence transcrite de *SLAAT* et *SIEXP1*. La RACE-PCR a été réalisée à partir du kit « 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen) utilisé selon les instructions du fabricant (figure II-8).



Les ARNm ont été rétrotranscrits à partir d'une amorce spécifique du gène (GSP1) en utilisant l'enzyme « Superscript II RNase H- reverse transcriptase. Les ADNc obtenus ont été, une première fois, amplifiés avec les amorces GSP1 et Abridged Anchor Primer (AAP, fournie dans le kit). Les produits d'amplification obtenus ont été ré-amplifiés avec les amorces GSP2 et Universal Anchor Primer (UAP, fournie dans le kit). Les produits d'amplifications obtenus ont été clonés dans vecteur pGemT Easy (Promega) et séquencés puis comparés aux banques d'EST de tomate.

2-5 transformation génétique des plantes

Clonage des séquences promotrices dans des vecteurs d'expression

Les séquences du promoteur *SlEXP1* ont été isolées par PCR (Isis polymérase, Qbiogene) à partir du plasmide pFH18 gracieusement fourni par F.A Hoebericht et E. Woltering (Agrotechnological Research Institute, Wageningen, Pays-Bas), en utilisant pour le fragment complet :

-l'amorce sens (5' AAAGAAAATAAAGAAAAAAGGGAGTTTGACC 3')

pour le fragment délété :

-l'amorce sens (5' ATCAAGCTTCCAGCAGCTAAGTTGGCAAA 3')

pour les deux fragments :

-une amorce reverse (5'ATCGGATCCTCTTAAGATTTAATGGAGTTGAGG 3').

Les fragments obtenus ont été clonés par ligation avec la ligase T4 (Promega) dans le vecteur binaire pLP100 (Szabados *et al.*, 1988) digéré par l'enzyme de restriction *SmaI*. Ce vecteur contient le gène rapporteur *UIDA* codant la β -glucuronidase, les fragments de promoteur ont été insérés en amont de cette séquence. Le promoteur AAT de tomate isolé précédemment a été amplifié par PCR (Isis polymérase, Qbiogene) en utilisant les amorces

G-AAT-F (5' AAAAAGCAGGCTTCGATATCAGACACTTGTGTTTTATCT 3') et

G-ATT-R (5' CAAGAAAGCTGGGTCATGTGATATACAACAAAGAGTAGTG 3') afin de lui rajouter les cassettes AttB1 et AttB2 (Invitrogen). L'amplicon obtenu a été cloné dans le vecteur pDONOR207 par réaction BP (Gateway technology, Invitrogen). Cette méthode de clonage est présentée dans la figure II-9. Puis, la séquence promotrice a été transférée dans le vecteur binaire pMDC162 contenant le gène rapporteur *UIDA* codant la β -glucuronidase par

une réaction LR (Invitrogen). Pour les transformations génétiques des plantes, des agrobactéries thermo-compétantes (*Agrobacterium tumefaciens*, souche C58) ont été transformées par choc thermique avec chaque vecteur binaires puis sélectionnées sur milieu contenant de la kanamycine 50 mg.L⁻¹, de la gentamycine 20 mg.L⁻¹ et de la rifampycine 50 mg.L⁻¹.

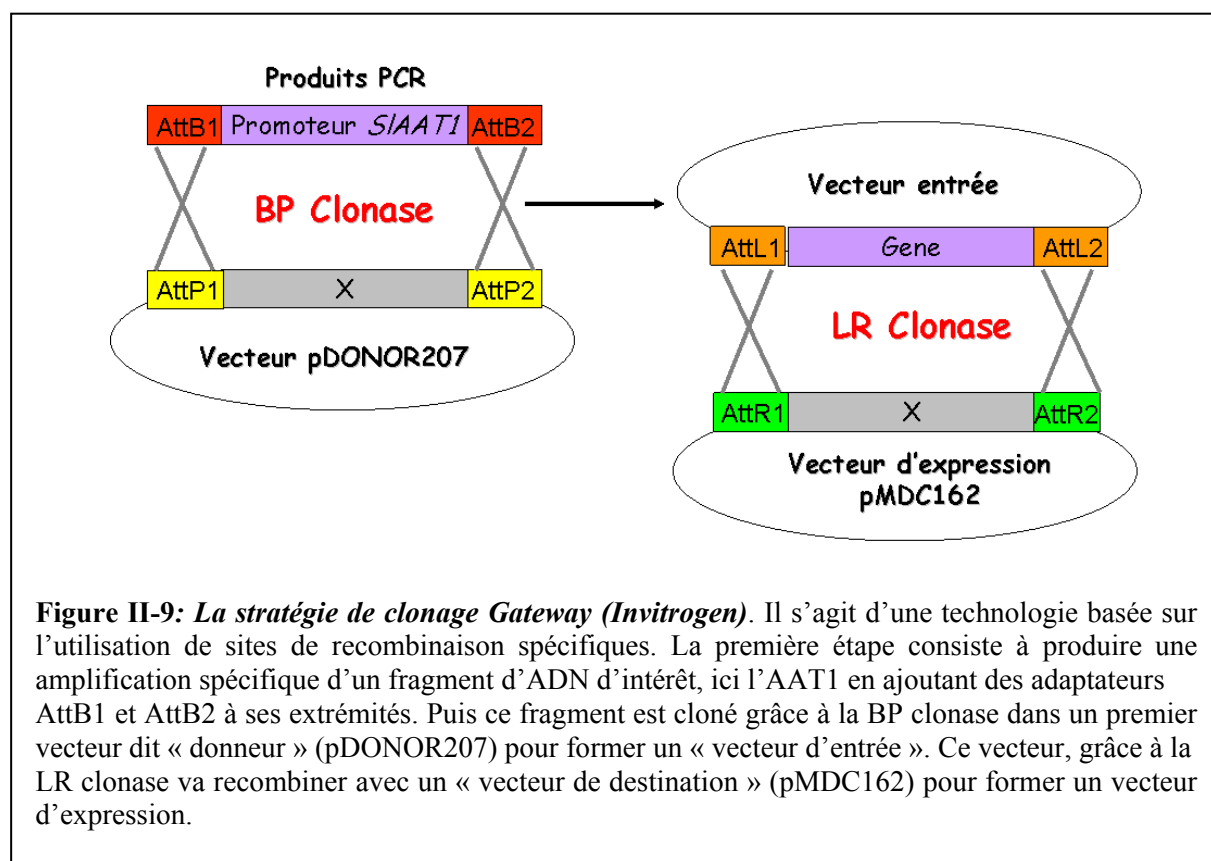


Figure II-9: La stratégie de clonage Gateway (Invitrogen). Il s'agit d'une technologie basée sur l'utilisation de sites de recombinaison spécifiques. La première étape consiste à produire une amplification spécifique d'un fragment d'ADN d'intérêt, ici l'AAT1 en ajoutant des adaptateurs *AttB1* et *AttB2* à ses extrémités. Puis ce fragment est cloné grâce à la BP clonase dans un premier vecteur dit « donneur » (pDONOR207) pour former un « vecteur d'entrée ». Ce vecteur, grâce à la LR clonase va recombinaisonner avec un « vecteur de destination » (pMDC162) pour former un vecteur d'expression.

Transformation génétique de la tomate par vecteur biologique

Les constructions présentant le gène rapporteur *GUS* fusionné avec les séquences promotrices de l'expansine et de l'*AAT* ont été introduites dans les plants de tomate de la variété Ailsa Craig, pour les constructions contenant des régions promotrices *EXP1* et de la variété MicroTom, pour le promoteur AAT. La transformation génétique a été réalisée à partir d'explants de cotylédons et d'hypocotyles et le vecteur binaire a été introduit *via* un vecteur biologique, *A. tumefaciens*. La transformation a été réalisée selon la méthode décrite par Jones *et al.*, (2002), avec des changements mineurs : des cotylédons de 6 jours ont été utilisés pour la transformation; la durée des sous-cultures pour la caulogénèse a été réduite à 15 jours et la concentration de kanamycine augmentée à 70 mg.L⁻¹. Les plantes régénérées (génération R0) ont été criblées pour la résistance à un agent de sélection en semant des graines sur le milieu

Murashige et Skoog 8% agar en présence de 70 mg.L⁻¹ de kanamycine pour les transformations avec le vecteur pLP100 et de l'hygromycine 25 mg.L⁻¹ pour les transformations avec le vecteur pMDC162. Toutes les expériences d'histochimie ont été réalisées en utilisant des lignées homozygotes de la génération R1 ou au-delà.

Transformation génétique d'Arabidopsis par vecteur biologique

Les agrobactéries contenant la construction à introduire dans la plante sont mises en pré-culture dans 10 mL de milieu LB contenant les antibiotiques appropriés (gentamycine 20 mg.L⁻¹, rifampicine 50 mg.L⁻¹ et kanamycine 50 mg.L⁻¹), pendant 24 h puis transférées dans 100 mL du même milieu pendant 24 h supplémentaires. La suspension bactérienne est ensuite centrifugée à 3000 rpm pendant 20 min, le surnageant est éliminé et le culot est re-suspendu dans une solution de saccharose (5% p/v) dans l'eau. La densité optique à 600 nm de cette solution est ajustée à 1,8 avec la solution de saccharose. 0.05% (v/v) de Silwet L77, (OSI specialties), un agent mouillant, a été ajouté à cette suspension. Les boutons floraux sont trempés pendant 30 sec dans la solution bactérienne. Les plantes sont ensuite cultivées en serre jusqu'à la sénescence (environ 3 mois). Les graines sont alors récoltées puis désinfectées par trempage pendant 15 min dans une solution d'hypochlorite de sodium à 10%. Après un rinçage abondant avec de l'eau UHQ stérile, plusieurs centaines de graines sont déposées dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Murashige et Skoog 8% agar et un antibiotique de sélection (Kanamycine 50 mg.L⁻¹ ou hygromycine 25 mg.L⁻¹). Les graines sont stratifiées à 4°C pendant 48h puis placées en salle de culture *in vitro* pendant 1 semaine (16h lumière à 25°C et 8h nuit à 20°C). La sélection des plantes transformées se fait visuellement par observation des plantules. Les analyses histochimiques ont été réalisées sur les plantes résistantes des générations R1 et R2.

2-6 Analyses des lignées transgéniques

Analyses histochimiques de l'activité GUS

L'activité de la β -glucuronidase (GUS) a été évaluée selon la méthode de Jefferson *et al.*, (1987). La localisation histochimique a été réalisée en utilisant une solution de coloration contenant 1mg/mL de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (Duchefa) dans du tampon phosphate 0.1M, pH 7, EDTA 10mM et Triton X100 à 0.1%. Les tissus ont été infiltrés sous

vide, deux fois, pendant 5 min et incubés à l'obscurité à 37°C pendant 16 h. Les tissus ont été par la suite fixés dans 0.3% de formaldéhyde dans un tampon phosphate 50mM, pH 7 en présence d'EDTA 1 mM, pendant 1 h à température ambiante. Ensuite la chlorophylle est éliminée par des lavages successifs de gradients d'éthanol (50 à 100%), finalement les tissus sont conservés dans l'éthanol à 50%.

Traitements hormonaux

Des plantes entières et des explants de tomate et d'*Arabidopsis* des lignées *expl-gus* et *aat-gus* ont été traités à l'éthylène 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ pendant 12 à 24 h dans des enceintes hermétiques. Des traitements similaires sont réalisés avec 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-méthylcyclopropène (1-MCP) un inhibiteur de l'action de l'éthylène.

2-7 Analyses d'interactions ADN/protéine par gel retard

Extraction de protéines nucléaires

Des extraits purifiés et semi-purifiés de protéines nucléaires ont été obtenus à partir de fruits au stade orange et au stade vert-mature et de feuille en utilisant le kit « Plant nuclei extraction » (Sigma).

Gel retard

Les expériences de gel retard ont nécessité l'utilisation de trois sondes décrites dans la figure II-10. Les sondes ont été obtenues par hybridation des fragments complémentaires simples brins correspondants (sens et reverse) avec 7.5 M NaCl, la réaction s'effectue à 100°C, pendant 2 min, puis le mélange est refroidit dans la glace. Les sondes ont été marquées au α P^{33} -dATP par remplissage de brins avec la polymérase Klenow (Promega) en incubant les échantillons pendant 15 min, à température ambiante puis, 60 min à 37°C. Elles ont été ensuite purifiées sur gel d'acrylamide pour enlever l'excès de α P^{33} -dATP non incorporé. Les réactions d'interaction des extraits protéiques avec la sonde ont été réalisées dans 20 μL avec 80 fmoles de sonde, 4 μL de tampon d'hybridation (5% glycerol, 20 mM tris-HCl pH8, 60 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ BSA) et 4 μL d'extraits nucléaires isolés précédemment. L'interaction est réalisée pendant 20 min à température ambiante. La spécificité de l'interaction ADN-protéine a été testée en présence d'un excès de sonde (native

ou mutée) non marquée (x100). La migration a été réalisée sur gel de polyacrylamide 6% dans du TBE 0.5X à 150V constant pendant 2 heures. Le gel a été ensuite fixé dans l'acide acétique 10% pendant 10 min, puis séché pendant 30 min. Un film autoradiographique (Fuji) a été exposé au gel pendant 2 à 24 h. L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un phosphoimageur « fujifilm Bas 5000 », l'analyse des gels retard ainsi que la quantification de la radioactivité ont été réalisés à l'aide du logiciel « Image Gauge » (Fuji).

A) ATATTATTAATTTATTTTTTCAAAA
B) AGAGGAGGAAGGGAGGGGGCAAAA
C) AAGAGCCGCCACTA

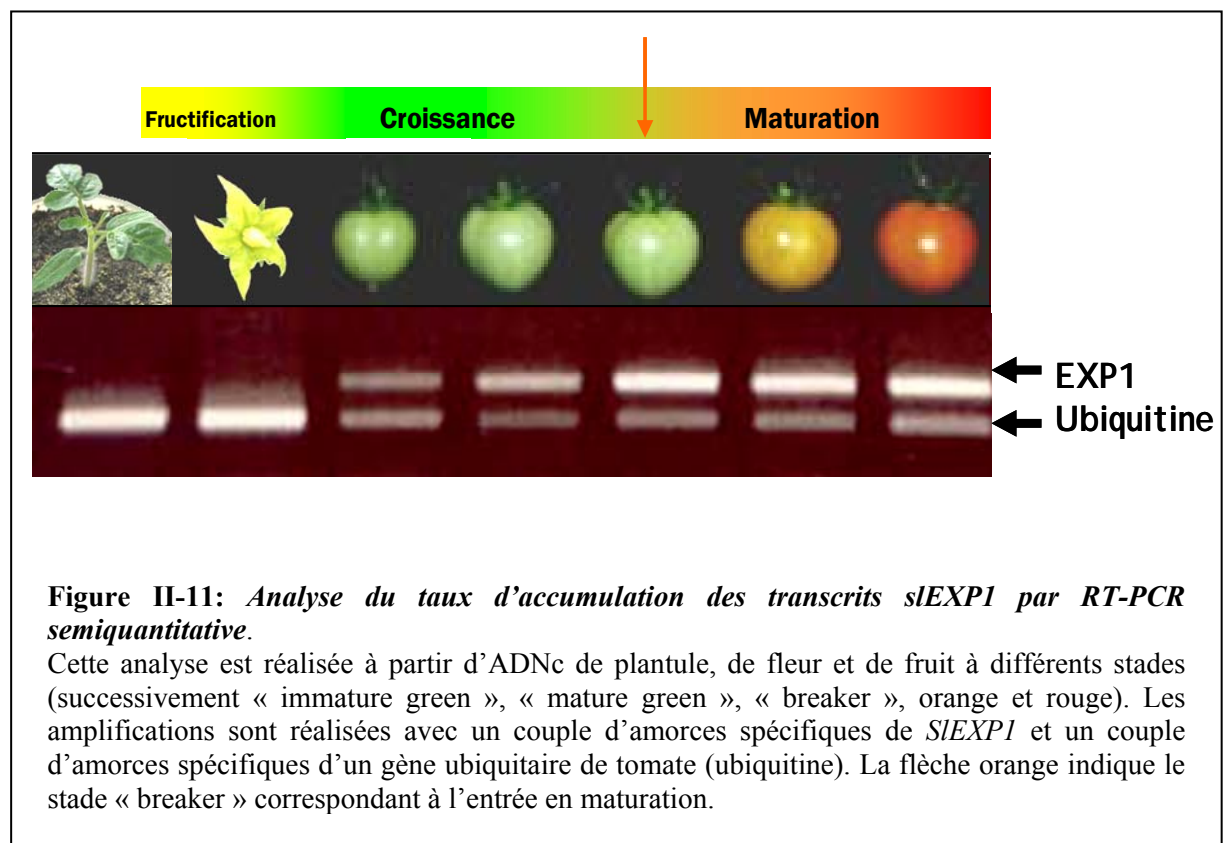
Figure II-10: Représentation des séquences nucléotidiques des sondes utilisées pour les expériences de gel retard. Il s'agit de l'élément de 21pb consensus natif (A), du même élément muté (B) et de la boîte GCC de la chitinase de tabac (C).

3-Résultats et discussion

3-1 Etude fonctionnelle du promoteur de l'expansine 1 de tomate

*3-1-1 Expression spatio-temporelle du gène *SlEXP1**

Des études antérieures de Brummel *et al.*, (1999) réalisées par la méthode de Northern-blot avaient montré que *SlEXP1* s'exprime de façon fruit-spécifique à partir du stade « breaker » (B). Aucune expression n'était observée dans les racines, les feuilles et les fleurs. Nous avons voulu vérifier ces données d'expression par la méthode de RT-PCR semi-quantitative. La figure II-11 montre une expression fruit-spécifique du gène et l'absence d'expression dans les feuilles et les fleurs. Toutefois, nous observons une induction de l'expression dans le fruit à partir du stade « vert immature » (Immature Green) et non à partir du stade B comme le montrent les travaux précédents.



Ces données sont confirmées par la suite grâce à l'exploitation des données de *microarrays* produites par l'université de Cornell et disponibles sur le site « Tomato Expression Database ». L'accumulation des transcrits correspondants à une EST du gène *SlEXP1* a été étudiée au cours du développement du fruit (figure II-12). Ainsi, nous observons une accumulation progressive des transcrits jusqu'au stade B puis, une forte augmentation jusqu'au stade tournant pour atteindre un maximum au stade orange. La tendance s'inverse à partir du stade orange (B+5) mais reste à un niveau équivalent à celui atteint au stade B et ce jusqu'au stade rouge (B+15). Dans l'ensemble, ces différentes analyses de l'expression confirment que le gène *SlEXP1* s'exprime de façon strictement fruit-spécifique. Les premiers transcrits s'accumulent à partir de la fin de la phase de croissance du fruit et cette accumulation s'accélère fortement pendant la phase climactérique. Cette augmentation est corroborée avec des travaux précédents qui montrent une régulation positive de l'expression par l'éthylène.

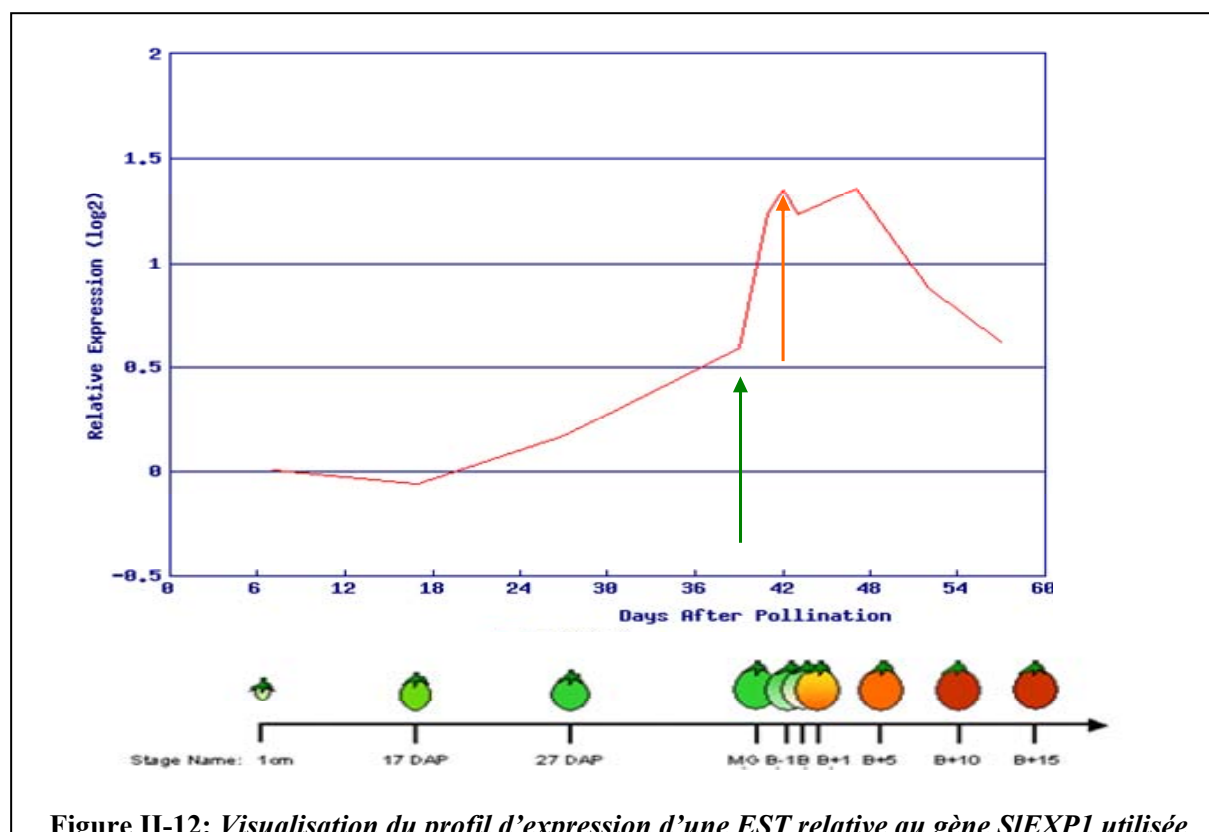


Figure II-12: Visualisation du profil d'expression d'une EST relative au gène *SlEXP1* utilisée comme sonde pour des analyses *microarrays*. Sont représentés les taux relatifs d'accumulation de l'EST dans le fruit, au cours de son développement. Les données sont représentées en fonction du jour après anthèse (days after pollination). La flèche verte signale le stade mature-green et la flèche orange marque le début de la maturation (stade *breaker*).
Source: Tomato Expression Database (<http://ted.bti.cornell.edu>).


```

1180 aaagaaaata aagaaaaaag ggagtttgac caaagtgaga tatgtagggc gtaatatatg ggccgatgat
1110 tgcggtggat agtttacctc aaatttgccc actttccata ttgtcaaaca cactatattta ttaatttatt
                                     Consensus-fruit
1040 tttcaaaaact tcacaattcc agcagctaag ttggcaaaaa gtgaaaccac taatcaacta atagacaaaa
970 ataaaataaa ataaaaacta gtactattat tatgtctcaa gttttgggca aaaacatgat atgctttaag
900 acaaagagaa ttttgtagca taatgagatg agactgttat tattattttc gtacctactt tcaattaatt
830 atgcaacgta acaacaattt tcaaacacaa gcaacttagg taaatatggt tcatttttagg ctcataatat
750 gatctctctg taccacctaa ttgtaataat tttacagtct taatatttat attatatatt ttttttcaca
                                     AT1-motif
680 tgagtatttt agataacttt caaatgaatt ttttttttct cttctgcatt caaatacata ttactgaaat
                                     CATT-motif
-610 tttagctaatt tttaacacgt attcaatttt gtatgattga atgtagacat aatggaaaaa ttgaaagggt
                                     G-Box
-540 gttaaataag tttattaatt ataaaacatt tgtatttcaa atttagttaa atagtgggag cggaaaattc
                                     ERE
-470 gggagtaatt aatgaaaatg tgtaaaaaag tgtcagtaga ttgacggaat taaagataaa aagcggctgc
-400 aagtgttcca tgggaaacct ttaatgtgat ttggaacttt ttttttctt ctttttttaa tccattcca
                                     I-Box
-330 ttccaatcaa atcaaaattaa aacaaaacca aaagattcag tattatgatt gtttcattca taatcagaga
                                     Circadian
-260 ttttatattt gagttttgaa ttttgttttt gaaagttcta ctttcgaatg agcattgcag tatgcgattc
-190 atatttagtt gaacctcaa tgcgagtga atttgaaaat acaaacacaa cgcactaaa cacacattta
-120 agacatctaa aatcaataga ctgtaccaac ctattatgtc c aatagtgttc aaaatatgtt atttaatcac
                                     +1
-50 tttgtatatt caatattttt ttccgacgat tggacaccta aaaataagac aaaacaaaaa acaaaataaa
+21 tattatttct ttttatgttt ttgttccgc caatatgtcc tttgattaag gaggacaaa cttaggtata
+91 cacacataat ttctctgtta taagtagtgc ttctcgttgc atcattttct tcaacaacct caactccatt
+161 aaatcttaag a ATG

```

Figure II-13: Représentation de la séquence du promoteur de l'expansine1 de tomate.

Cette séquence de 1340 pb en amont du codon ATG présente des *cis*-éléments régulateurs putatifs interagissant avec des facteurs de transcription connus pour être impliqués dans le processus de maturation du fruit, comme le lumière, l'éthylène et le cycle circadien. La séquence 5' UTR identifiée par RACE-PCR est représentée en rouge, le site d'initiation de la transcription est noté « +1 ».

3-1-2 Analyse de la séquence promotrice de *SIEXP1*

Un fragment de 1341 bp situé en amont de la séquence codante du gène *SIEXP1* est disponible sur les bases de données (GenBank: AY534531). La détermination du point d'initiation de la transcription a été entreprise par la technique de 5'RACE PCR. Une série d'amorces chevauchantes a été dessinée sur la séquence 5'UTR connue. Par cette méthode, une séquence 5'UTR de 171 pb a pu être déterminée et nous permet de localiser le point d'initiation de la transcription (figure II-13). Une analyse *in silico* de ce promoteur a été entreprise afin d'identifier des *cis*-éléments régulateurs putatifs. Cette analyse a été réalisée en combinant les données obtenues avec les outils de détection PLACE et PlantCare. (Lescot *et al.*, 2002, Higo *et al.*, 1999). Une TATA box et une CAAT box sont localisées respectivement en position -46 et -81 (figure II-13). Outre ces éléments de régulation canoniques, d'autres *cis*-éléments régulateurs putatifs ont été identifiés (figure II-13). Deux éléments de réponse à l'éthylène, décrits par Montgomery *et al.*, (1993) et Itzhaki *et al.*, (1994), sont présents aux positions -417 (ATTTCAAA) et -678 (AATTCAAA). De plus, un ensemble de *cis*-éléments liés à la réponse à la lumière tels que les motifs « I-BOX », « AT1 », « G-Box » et « CATT-motif » (Gilmartin *et al.*, 1990). Un récapitulatif des séquences régulatrices potentielles de la région promotrice *SIEXP1* identifiées par le programme PlantCare est présenté sous forme de tableau (figure II-14) qui répertorie les éléments décrits ci-dessus qui participent à la régulation génique dépendante de facteurs pouvant être impliqués dans le contrôle de la maturation.

Cis-élément	Espèce	Consensus	Position	Fonction putative
PERE	<i>Dianthus caryophyllus</i>	ATTTCAAA	500	Élément de réponse primaire à l'éthylène
I-box	<i>Flaveria trinervia</i>	CATATCCAAT	323	Réponse à la lumière
AT1-motif	<i>Solanum tuberosum</i>	ATTAATTTTACA	715	Réponse à la lumière
G-box	<i>Brassica oleracea</i>	TAACACGTAG	590	Réponse à la lumière
CATT-motif	<i>Zea mays</i>	GCATTC	629	Réponse à la lumière
Circadian clock	<i>Solanum Lycopersicon</i>	CAANNNNATC	318	Régulation par le cycle circadian

Figure II-14: Identification de cis-éléments régulateurs putatifs dans la séquence de la région promotrice de *SIEXP1*. Les éléments identifiés ici sont impliqués dans des voies de signalisations régulatrices du processus de maturation des fruits. La position est exprimée en nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription.

3-1-3 Identification d'un cis-élément putatif par comparaison de séquence

Les travaux décrits dans la thèse de F.A. Hoeberichts (2002) suggèrent la présence de *cis*-éléments putatifs régulant positivement la transcription du gène dans le fruit orange et qui seraient situés dans la partie distale du promoteur du gène de l'expansine1. Pour tenter d'identifier ces éléments, des analyses *in silico* de comparaisons de séquences ont été effectuées à partir des séquences de différents promoteurs connus pour être fruit-spécifiques et de la séquence promotrice *SlEXP1*. Ces analyses révèlent la présence d'une région conservée présente dans la partie distale du promoteur (-1212 pb en amont du site d'initiation de la transcription). Cet élément consensus de 21 pb (TTATTAATTTATTTTCAAAA) est présent dans la séquence des promoteurs *PG* (-1767), *ACS2* (-1012) et d'*EXP1* (figure II-15) de tomate. Cet élément conservé dans au moins trois promoteur de gènes connus pour être fruit-spécifiques, pourrait être impliqué dans la régulation de l'expression spatio-temporelle des gènes soit en tant que régulateur positif de l'expression dans les fruits, soit en tant que répresseur de l'expression dans les autres tissus. Cependant, au cours de cette analyse, aucune séquence consensus n'a pu être identifiée en comparant ces séquences avec les autres promoteurs fruits spécifiques connus tels que 2A11, E4 et E8.

```

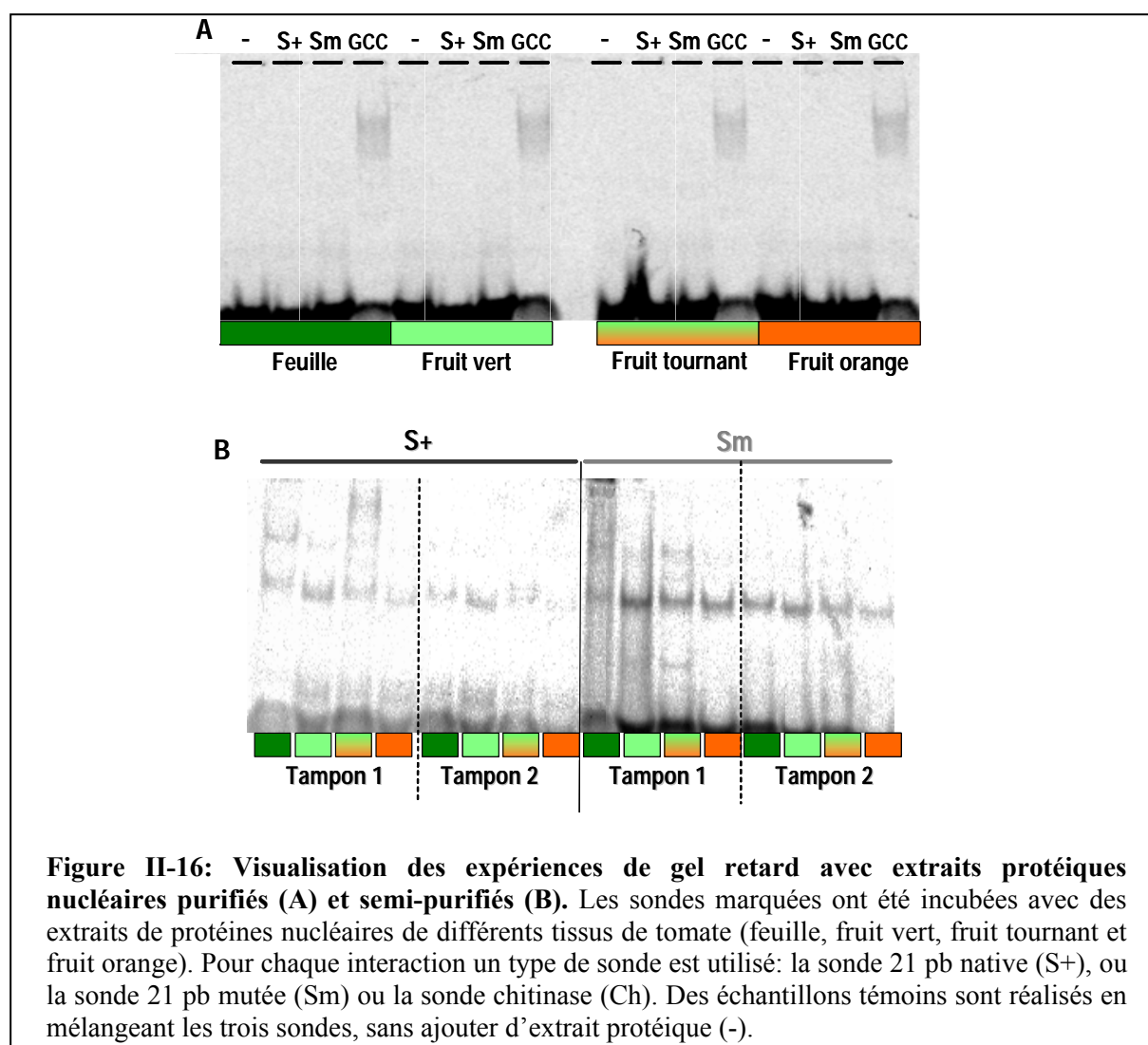
SlEXP1  5'AAACACACTATATTATTAATTTATTTTCAAAACTTCACAATTCCAG 3'
SlPG    5'ACAAATTATTTCTCATTAATTTATTTTCAAAATTAACTGATTCCAA 3'
SlACS2  5'AAAATAAATAAATTTTTAATTTATTTTCATATTTGATTAATAAGCA 3'
  
```

Figure II-15: Alignement local des séquences de promoteurs fruit-spécifiques. A partir de cet alignement une séquence consensus de 21 pb putativement impliquée dans la régulation de l'expression spatio-temporelle de ces gènes a pu être définie (ici soulignée). Trois promoteurs de tomate ont été retenus à partir des alignements de séquences, celui de l'expansine1 (*SlEXP1*), de l'ACC synthase (*ACS2*) et le la polygalacturonase (*SlPG*).

3-1-4 Analyses *in vitro* de l'interaction entre le cis-élément putatif et des facteurs nucléaires

Afin de vérifier si l'élément *cis*-régulateur de 21 pb, identifié précédemment dans des promoteurs fruit-spécifiques, peut être reconnu par des facteurs de transcription présents dans le fruit, des expériences de gel retard ont été entreprises. Des extraits de protéines nucléaires, sont préparés à partir de feuilles et de fruits prélevés à différents stades (vert, « breaker », « breaker », « breaker »).

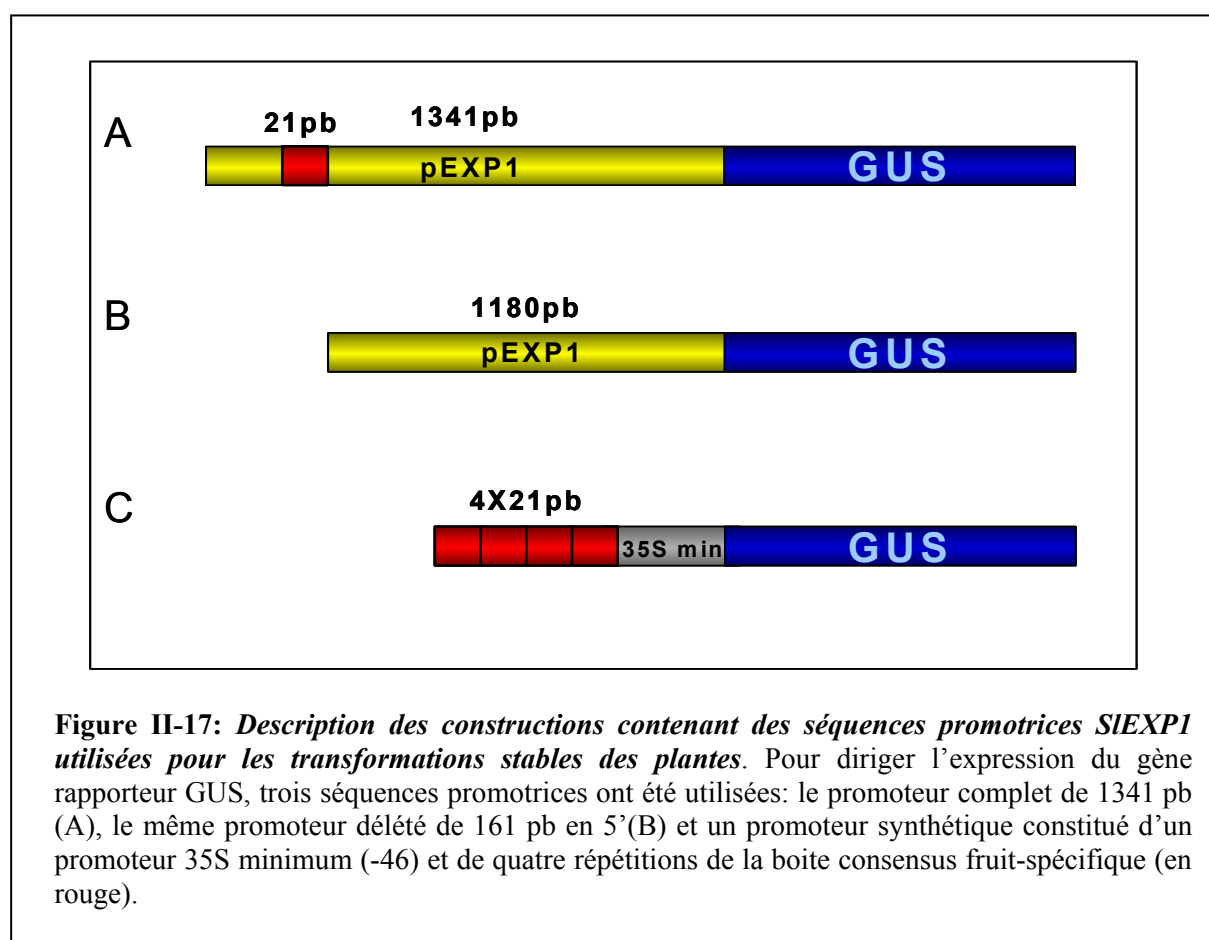
orange). Pour s'assurer de la spécificité des retards observés, les expériences de gel retard sont réalisées avec deux types de sondes: une séquence consensus de l'élément de 21 pb et sa version mutée (figure II-10). De plus, une sonde contenant le *cis*-élément de réponse à l'éthylène « GCC box » (Ohme-takagi et Shinshi, 1995) isolée à partir du promoteur du gène codant la chitinase de tabac, est utilisée comme témoin dans ces expériences et ce, afin de vérifier la qualité des extraits nucléaires. Cette sonde a été utilisée avec succès, dans des travaux antérieurs visant à étudier la fixation de facteurs de transcription de la famille des ERF (Ethylene Responsive Factors) par Tournier *et al.* (2003). Ces expériences de gel retard ont tout d'abord été réalisées à partir d'extraits nucléaires purifiés. Dans ces conditions d'interaction, aucun retard significatif n'est observé que se soit pour la sonde native ou pour la sonde mutée. En revanche, la sonde GCC présente des retards de migration en présence des protéines nucléaires et ce, quelque soit l'extrait testé. Un exemple de migration avec des extraits purifiés est présenté dans la figure II-16.



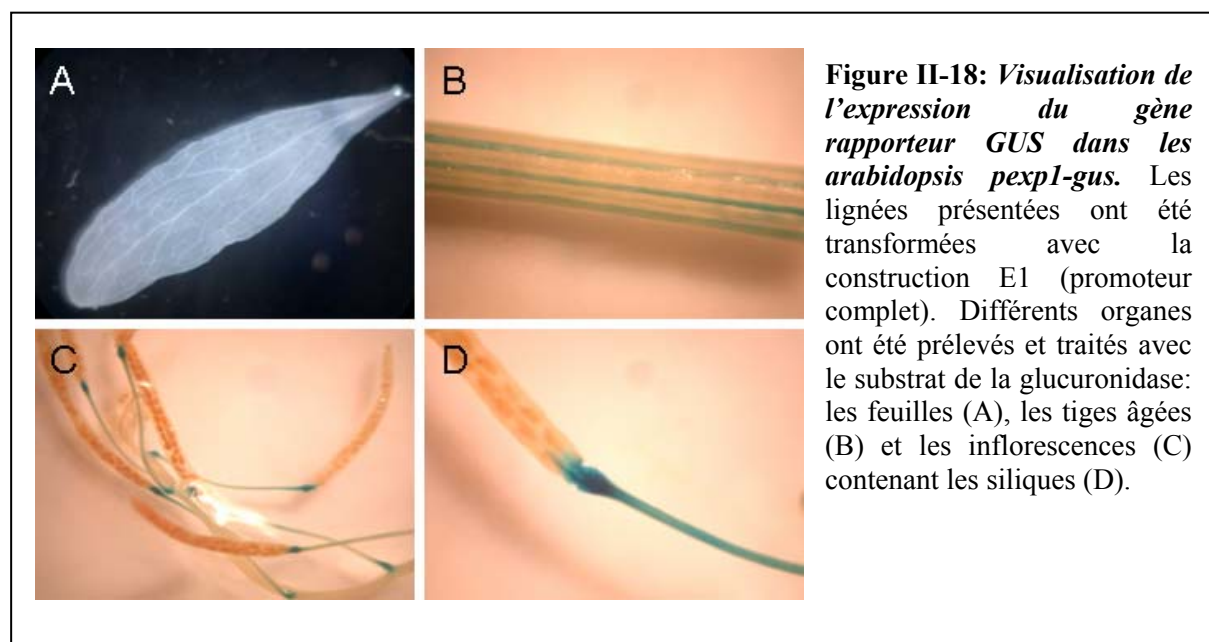
Afin de persévérer dans cette approche et de mettre en évidence des bandes retardées détectables, les expériences ont été reproduites avec des extraits de protéines nucléaires semi-purifiées et en modifiant les conditions salines lors des étapes d'interaction ADN-protéines. Dans ce cas, nous avons pu mettre en évidence la présence de bandes retardées quelque soit la condition testée et que la sonde soit native ou mutée suggérant cependant une absence de spécificité des retards observés. Plusieurs combinaisons ont été testées, en faisant varier les conditions salines, le temps et la température d'interaction, les quantités de sonde, de protéine, de compétiteur. Comme attendu, la sonde témoin GCC de la chitinase montre des retards sur gel spécifiques résultants d'interactions spécifiques avec les protéines nucléaires décrites dans la littérature. Cependant, toutes les expériences réalisées avec la séquence consensus de 21 pb montrent une absence de spécificité des retards observés sur gel. Ce *cis*-élément putatif n'interagit pas avec des facteurs nucléaires dans les conditions testées, c'est à dire *in vitro* avec des extraits nucléaires totaux. Malgré cela, le rôle putatif de cet élément sera évalué *in planta* par une approche de transgénèse en utilisant un gène rapporteur.

3-1-5 Analyses de l'expression du gène rapporteur *GUS* sous le contrôle de régions promotrices *EXP1*

La séquence codante du gène rapporteur *GUS* codant la β -glucuronidase a été fusionnée aux régions promotrices de *SlEXP1* afin de visualiser leur profil d'expression *in planta* chez la tomate et chez arabette. Différentes régions promotrices ont été testées pour ces études d'expression *in planta* (figure II-17). La première construction désignée E1 contient la séquence promotrice de 1342 pb du gène *SlEXP1* située en amont du site d'initiation de la traduction. La seconde, appelée E2 contient le même promoteur délété de 160 pb dans sa région distale. C'est dans cette région qu'est localisé l'élément putatif de 21 pb identifié précédemment (paragraphe 3-1-3). La troisième construction utilisée en transformation stable, appelée E3, contient un promoteur synthétique composé de 4 répétitions du *cis*-élément putatif de 21 pb associé à un promoteur CaMV35S minimum (-46). Le promoteur minimal ne peut pas à lui seul induire l'expression d'un gène rapporteur mais peut être activé par des éléments dits « *enhancer* » placés en amont. Les analyses histochimiques des plantes ont été réalisées en prélevant des explants (fruits, feuilles, tiges, fleurs) et en les incubant dans une solution contenant du X-Glu comme substrat de la β -glucuronidase.



Afin de valider la fonctionnalité des constructions E1, E2 et E3, celles-ci ont tout d'abord été utilisées pour transformer des plants d'*Arabidopsis*. Pour ces trois constructions, les plantes générées ne présentent pas d'activité GUS dans les feuilles (figure II-18-A) et les tiges jeunes. En revanche, les *Arabidopsis* transformées avec la construction E1 présentent une expression du gène rapporteur dans d'autres tissus : les tiges âgées (à partir de 5 semaines), mais aussi les zones d'abscission de silique (figure II-18-B à D). La construction E1 est fonctionnelle chez *Arabidopsis* en revanche les constructions E2 et E3 ne permettent pas d'obtenir un niveau d'expression du gène rapporteur détectable avec la méthode histochimique GUS. Le profil d'expression observé pour E1 semble être corrélé avec l'abscission et la sénescence, mécanismes connus pour être régulés par l'éthylène. Par contre, aucune expression n'est détectée dans l'enveloppe de la silique qui est le fruit déhiscent chez *Arabidopsis*.



Des tomates de la variété Ailsa Craig exprimant ces constructions de façon stable ont également été obtenues et analysées par histochimie GUS. L'analyse des transformants E1 obtenus montre l'absence d'activité GUS au niveau des parties végétatives (figure II-19-A) et une faible expression du promoteur de 1342 pb dans le fruit (figure II-19-B). Cette expression difficilement détectable n'est pas augmentée par un traitement éthylène. En revanche, les transformants E2 et E3 ne présentent pas d'expression détectable par cette méthode histochimique (figure II-19-B) même en présence d'éthylène exogène.

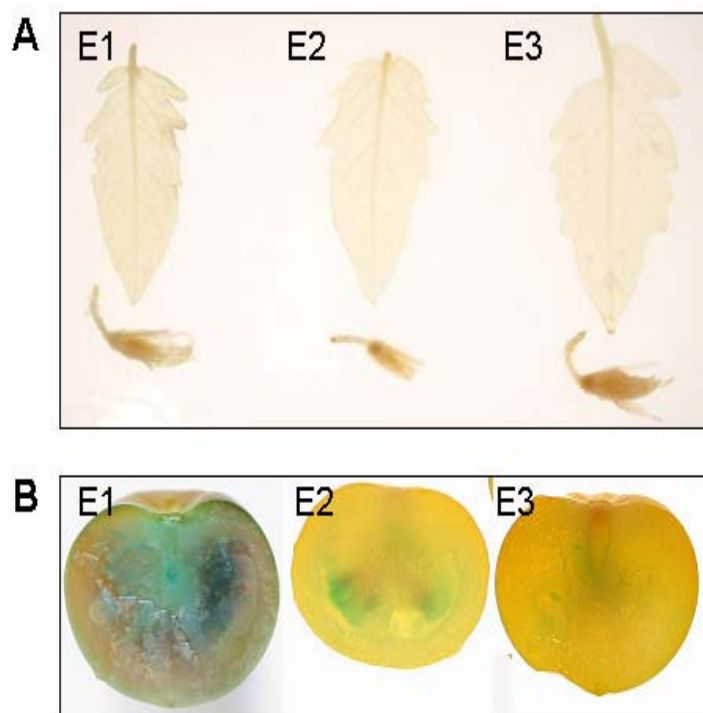


Figure II-19: Visualisation de l'expression du gène rapporteur *GUS* dans les lignées de tomate *Ailsa Craig pexp1-gus*. Différents tissus provenant des lignées exprimant une des trois constructions (E1, E2 ou E3) ont été prélevés et traités avec le substrat de la glucuronidase. L'expression est visualisée dans les feuilles et les fleurs (A) et dans les fruits au stade orange (B).

Des analyses préliminaires sur des extraits protéiques de ces tomates transgéniques ont été par la suite réalisées par une méthode de détection plus fine utilisant le substrat MUG (4-méthylumbelliféryl- β -D-glucuronide). Ces analyses montrent l'absence d'activité glucuronidase détectable dans les plantes transformées avec les constructions E2 et E3, confirmant ainsi les observations faites *in planta* avec le substrat MUG. Les plantes transformées avec E1 et analysées avec la même méthode ne présentent pas d'expression dans les parties végétatives, en revanche une faible expression a pu être détectée dans le fruit au cours de la maturation (résultats non présentés).

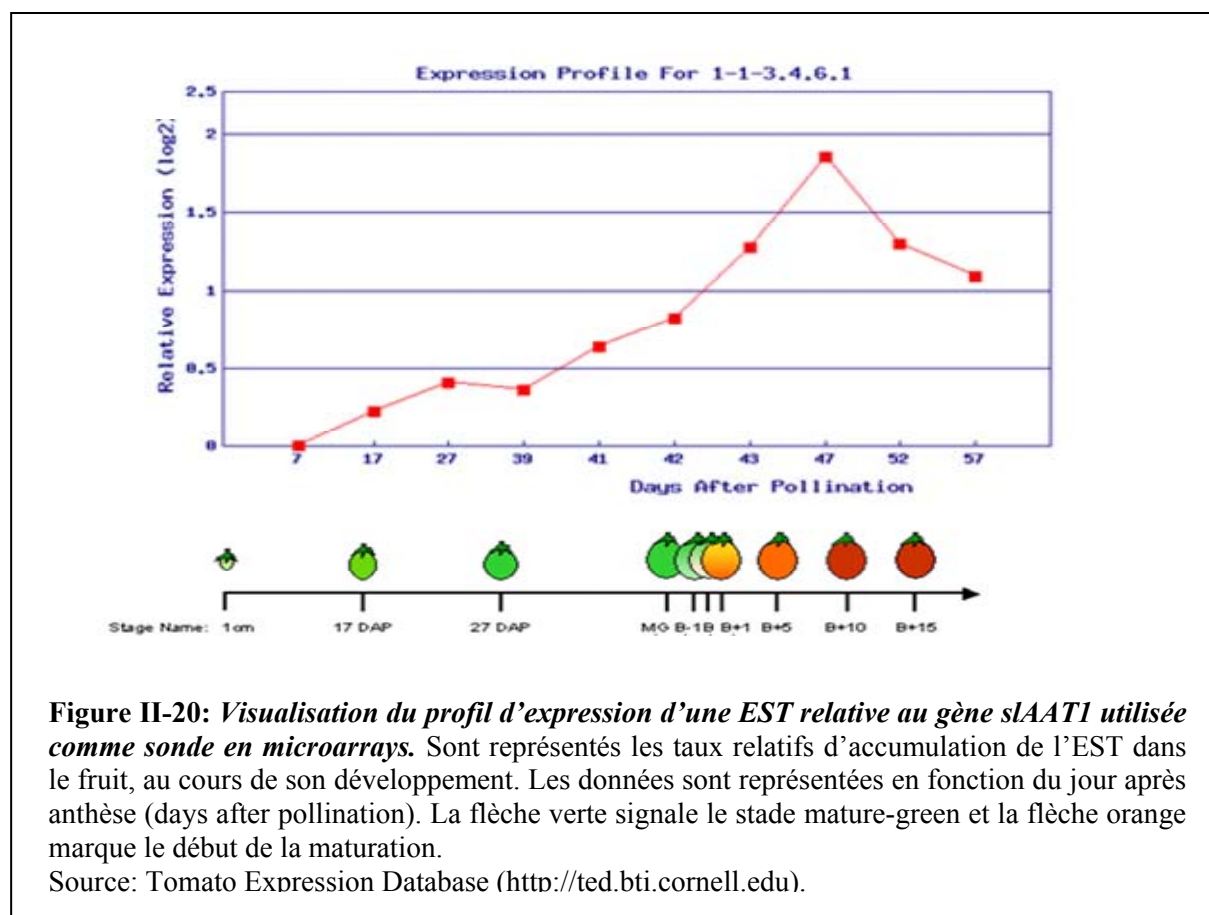
La région distale du promoteur de 1342 pb est nécessaire pour obtenir un minimum d'expression dans le fruit de tomate. En revanche, la délétion induit une absence totale d'expression. Ce qui peut suggérer la présence d'un élément régulateur positif dans la région 5' du promoteur mais qui n'est pas suffisant pour conférer au gène rapporteur une expression à un niveau identique à *EXPI*. L'analyse fonctionnelle du promoteur synthétique montre que la séquence de 21pb n'est pas directement impliquée dans la régulation spatio-temporelle dans le fruit, ou qu'il ne peut pas réguler à lui seul l'activité transcriptionnelle. Ainsi, la régulation spatio-temporelle reposerait vraisemblablement sur la coopération de plusieurs éléments *cis*-

régulateurs. L'ensemble de ces résultats nous ont conduit à rechercher d'autres candidats parmi les gènes exprimés spécifiquement dans le fruit.

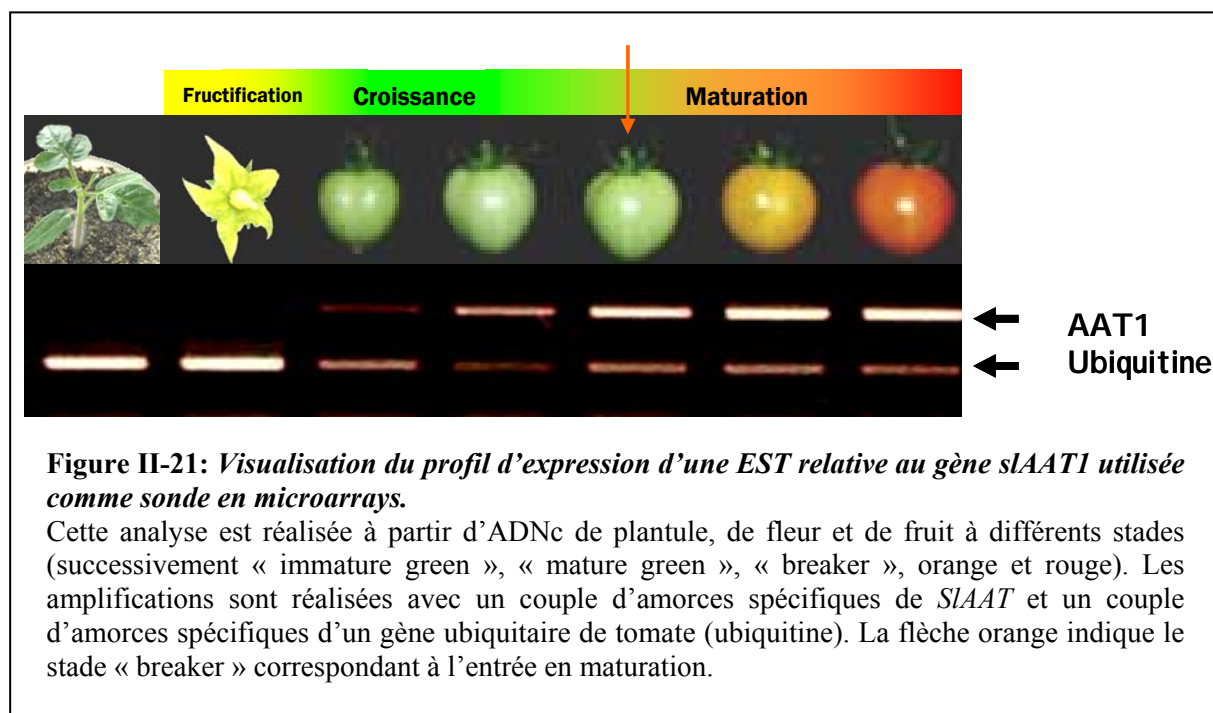
3-2 Etude fonctionnelle du promoteur d'une alcool acyl-transférase de tomate AAT

3-2-1 Expression spatio-temporelle

Des analyses *in silico* du transcriptome de la tomate ont été entreprises à partir des bases de données d'EST de tomate. Ces analyses ont été menées à partir des séquences codantes, non redondantes, déposées sur *microarrays* (Université de Cornell). Ainsi, nous avons identifié des gènes exprimés fortement et spécifiquement dans le fruit de tomate, parmi eux, figure le gène codant l'alcool acyl-transférase de tomate (*SLAAT*). Le profil d'expression, issue des analyses *microarrays* (TED) d'une EST relative au gène *SLAAT1* est présenté dans la figure II-20.



Afin de vérifier le profil d'expression spatio-temporelle de *SLAAT*, des expériences de RT-PCR semi-quantitatives ont été entreprises. L'analyse des transcrits a été réalisée à différents stades de développement du fruit de tomate (figure II-21), pendant la phase de développement (stade vert immature et vert mature), ainsi que dans les tissus végétatifs (plantule, fleur). Pour évaluer le niveau d'expression de *SLAAT* dans chaque échantillon, une co-amplification du gène cible et d'un contrôle interne (ubiquitine) a été réalisée par PCR (figure II-21). Les amplifications obtenues montrent une absence de transcrits dans les parties végétatives testées. En revanche, l'expression de l'AAT est induite à partir du stade vert immature et augmente graduellement au cours de la maturation pour atteindre un niveau d'expression maximal pendant la maturation, au stade fruit rouge. Ces résultats montrent que l'AAT est effectivement un gène fruit spécifique, fortement exprimé au cours de la maturation avec un pic d'accumulation des transcrits pendant la maturation.



Le profil d'expression observé en RT-PCR est corrélé avec les données de *microarrays*. Compte tenu de sa spécificité d'expression ce gène se présente comme un bon candidat pour la caractérisation d'un nouveau promoteur.

```

-1490  tgatatcaga  cacttgtggt  ttatctaacc  attagccatg  aaaaaATTTC AAgaagtgtg  ctatgaaatg
                                     ERE
-1420  acttttagaaa  atAAGGAAGA  agtcaacata  atttaaagga  tgtaaaagtg  aaataaatta  aaattatgga
                                     GA-motif
-1350  gcttgtaata  tttcatcatt  ttcttattaa  aaagtacttg  taaatgatgt  atgatattta  gaaatctaata
-1280  tatatgtttt  atgtttgatt  gaaaagtatt  tttattttat  tttttgaatt  aagaaatttc  gtttatttta
-1210  tgttattaat  ttaaagtttg  atttatttat  gcgattttta  tttgagaaaa  ggcttattta  tgtcttttta
-1140  aagttcgata  gcatattttt  agtttttcct  ctttaaaaat  gatttattta  attatgtggc  caaactatta
-1070  ttgatcatgt  gtaaaaaata  attttgcgaa  atcgaaagta  caattTTTAG ATAATAaata  ttgatatgag
                                     I-BOX
-1000  tgaacctttt  ttaaaacgaa  aatgacataa  acgagtgata  ctttatacaa  aatcataatg  aatcttttct
-930   caaaataagt  ttctataaaa  ataactatta  attaaataat  catacgcaat  atattaactc  ctcttctact
-860   atacacataa  taaaaggttt  agataaaaga  gatatagtat  aaaaaaagt  ttagataaag  gatcaatgta
-790   cagtatgaaa  ttaacatata  ctctttctcc  gcatcaattt  atttatctta  ttttttttaa  gttagcctaa
-720   aaaagaatat  ctttttatta  atttttaatt  tatatttttc  atacgcaaga  ctataaaatt  aaagaatatt
-650   tgaacactta  tgtattacgc  aactttaact  tcaagtcaca  aaatgcaaaa  aaaaaaaaaa  aaacctttta
-580   cttattttaa  cttaatatga  aataaaaatc  acaataatta  ataaattaaa  acaaaagaag  taccttttaa
-510   cttactgggt  attgtgacta  ctagtctaga  aacatttaac  tagcaagtag  attccaagac  gttttgtttt
-440   tccctctttc  atcatcaagt  gtacgtttta  ttccttcgat  tcatttaact  tgtcatgttg  tgtattcaag
-370   aatttttaat  tttttacgaa  atattaaatt  taaggataaa  atttGATTGA TTTGAcattt  aaatttttag
                                     Circadian
-300   ataaaagaaa  gataatgtga  attctacggt  aattgagcaa  agatcattat  aagaaacaat  acgcaatctt
-230   gccatggtag  acaactaaag  aatcaatata  CAATatgaac  ataatcttgt  cttacgtatc  aatttcttta
-160   tttttttact  tccctttttt  ttTATAAttc  tctaatttta  aatttctagg  tgacatacat  tgttggaag
-90    ttgaaaaacc  tataaaagag  ttttgatgat  tgataaagtg  aatatgggtc  accacttggt  ttcttatgta
-20    tactctaaca  acctttcaag  attgccctac  ggcccgta  ttgtaaaaaa  accatctagg  gattcgctact
+51   aaatttcagg  tgcctaaac  ggctcgttta  gggtttcgtg  aagggtccct  ggctgttaa  ctactctag
+121  tctctctcga  agtcttaggt  gttacaatga  catagcatga  aactttaaaa  tttagcaaat  gttgagcaaa
+191  aaaaagagta  ttgaagcaaa  actttaaaat  tttcaacctt  taagatgaga  aatctaagcc  tataaagaat
+261  aaagctaaaa  tgggtcaattc  atgaatgcat  agtttgatag  tgaaagatat  atatatataa  gtaattttt
+331  aattttttgt  atctcccatc  ttttaatacc  ttataaaatc  aacatcaata  aaaatttgta  aaaaatttga
+401  aggttgatat  ttatttgata  cattggccct  ctataaatct  aattcacaat  acaaaattgt  attactctca
+471  tcatacacta  ctctttgttg  tatatcacat  ATG

```

Figure II-22: représentation de la séquence du promoteur de l' *AAT1* de tomate. Cette séquence de 1340pb en amont du codon ATG présente des cis-éléments régulateurs putatifs impliqués dans des voies de signalisation de facteurs connus pour être impliqués dans la maturation du fruit, comme le lumière, l'éthylène et le cycle circadien. La séquence 5' UTR identifiée par RACE-PCR est représentée en rouge, le site d'initiation de la transcription est noté « +1 ».

3-2-2 Isolement et analyse de la séquence promotrice de *SLAAT*

Le promoteur de *SLAAT* a été isolé à partir d'ADN génomique de tomate, grâce à la méthode de marche sur le chromosome. Pour cela des amorces spécifiques ont été déterminées à partir de la région 5' de la séquence codante de l'AAT de tomate. Cette méthode nous a permis d'isoler un fragment d'environ 2 Kb en amont de la séquence codante du gène. Le point d'initiation de la transcription déterminé par 5'RACE, permet de mettre en évidence une séquence 5'UTR de 500 pb en amont du site d'initiation de la traduction (figure II-22). Des analyses *in silico* des séquences promotrices (PLACE et Plant Care) permettent l'identification de *cis*-éléments putatifs (figure II-23). Au niveau du promoteur central, la séquence montre la présence d'un motif TATA putatif en position -134 par rapport au site d'initiation de la transcription (+1). Ce motif est précédé d'un motif CAAT putatif en position -197. Nous avons recherché à identifier des *cis*-éléments dans la région distale du promoteur. Ainsi, des *cis*-éléments putatifs impliqués dans la régulation transcriptionnelle dépendante de la lumière ont été identifiés : un motif I-BOX en position -1015 et une boîte de type GA-motif en position -1401. Un motif putatif impliqué dans la régulation génique dépendante du cycle circadien a pu être identifié en position -316. Un élément putatif de réponse à l'éthylène ERE est présent en position -1438. Les éléments décrits ci-dessus participent à la régulation génique dépendante de facteurs pouvant être impliqués dans le contrôle de la maturation. Cette séquence promotrice a été utilisée par la suite pour tester son importance dans la régulation transcriptionnelle du gène AAT dans le fruit.

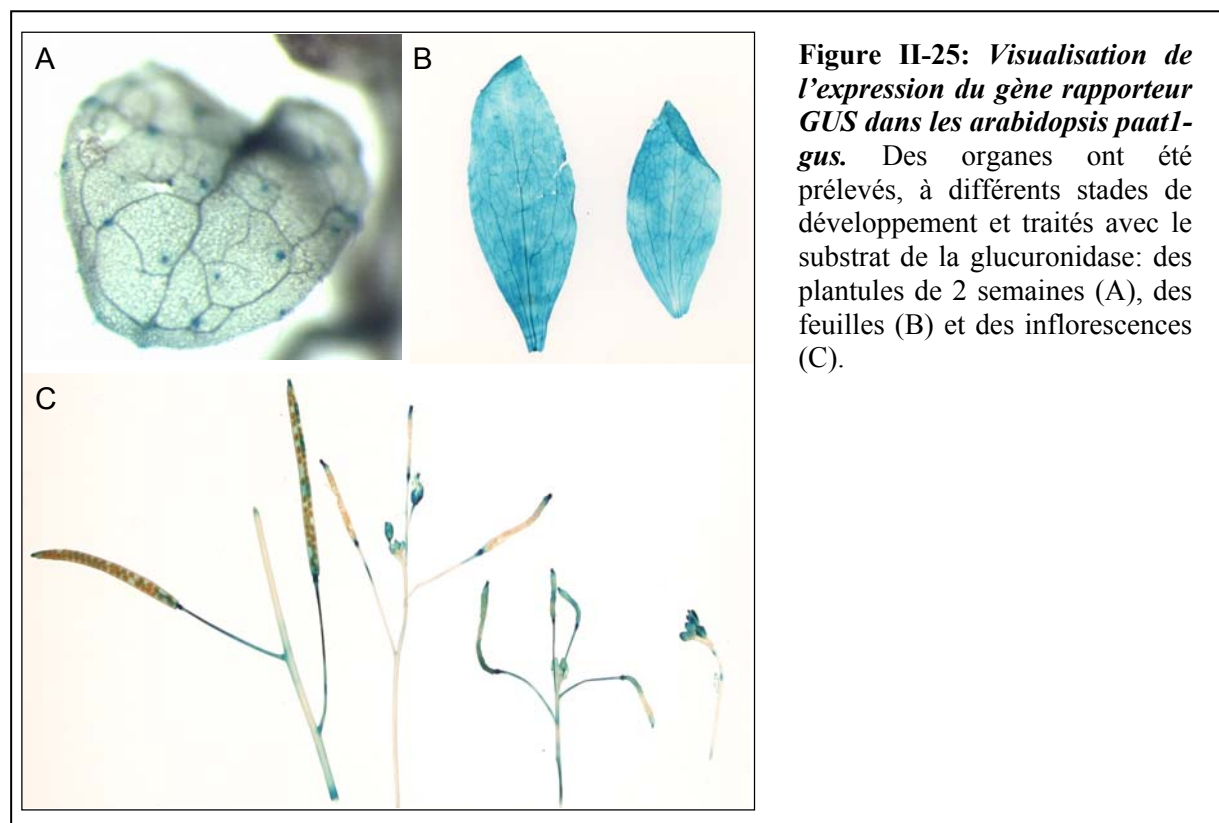
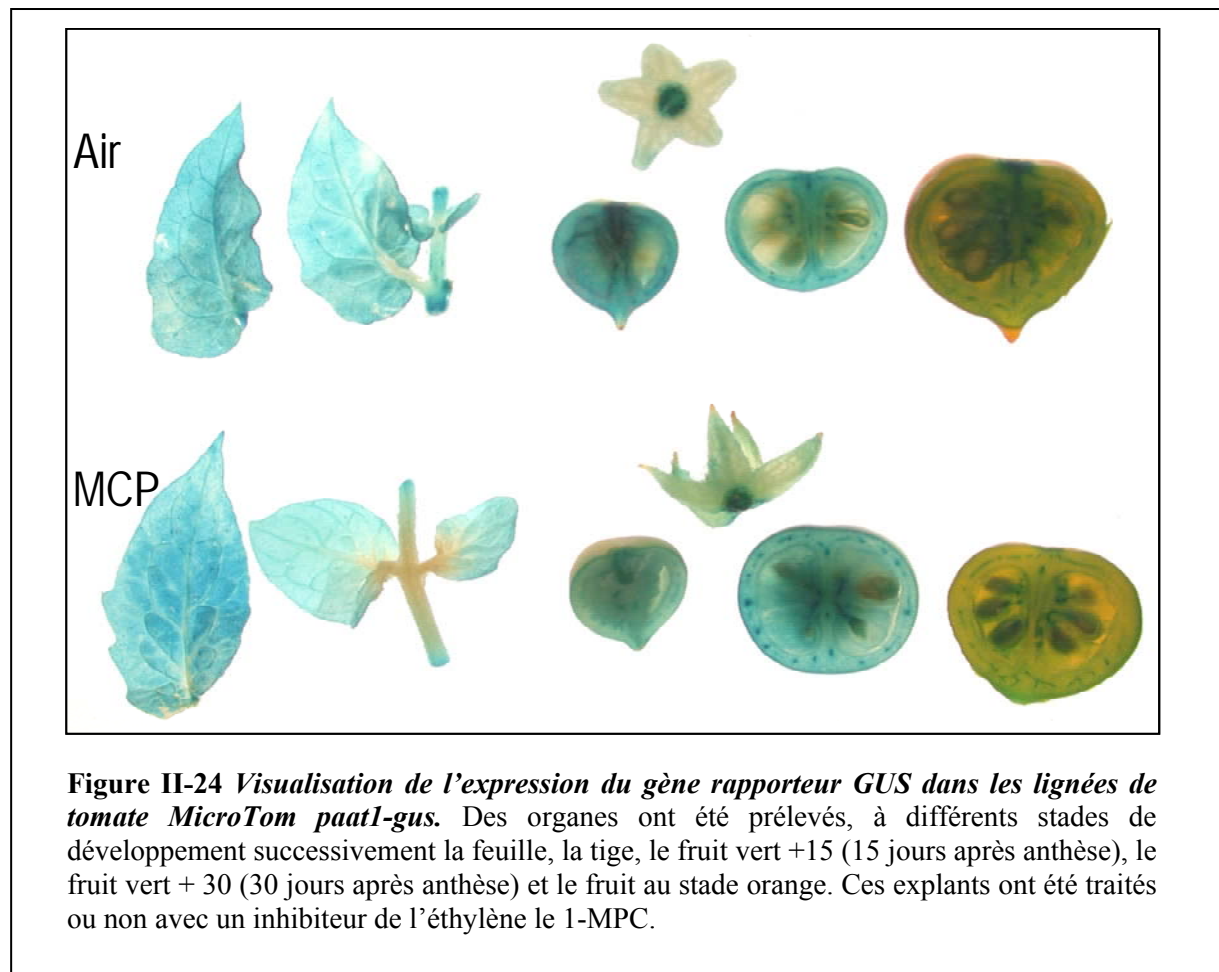
Cis-élément	Espèce	Consensus	Position /orientation	Fonction putative
I-box	<i>Flaveria trinervia</i>	CATATCCAAT	-1015 (-)	Réponse à la lumière
GA-motif	<i>Glycine max</i>	AAGGAAGA	-1401/ (+)	Réponse à la lumière
ERE	<i>Dianthus caryophyllus</i>	ATTTCAAA	-1438/ (+)	Element de réponse à l'éthylène
Circadian clock	<i>Solanum Lycopersicon</i>	CAANNNNATC	-316/ (-)	Régulation par le cycle circadian

Figure II-23: Identification de *cis*-éléments régulateurs putatifs dans la séquence de la région promotrice de *SLAAT1*. Les éléments identifiés ici sont impliqués dans des voies de signalisations régulatrices du processus de maturation des fruits. La position de chaque séquence est exprimée en nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription et l'orientation sens (+) ou antisens (-) est indiquée.

3-2-3 Analyse de l'expression du gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur de l'AAT

Comme pour l'analyse du promoteur de l'expansine1, la séquence du gène rapporteur GUS codant la β -glucuronidase a été fusionnée à 2 kb de séquence promotrices en amont de l'ATG du gène *AAT* afin de suivre le profil d'expression chez *Arabidopsis* et chez la tomate MicroTom. Les profils obtenus montrent une expression constitutive dans le fruit quelque soit le stade étudié, mais aussi, une forte expression dans les feuilles (figure II-24) ainsi que dans les zones coupées ou blessées lors de la préparation des échantillons. Afin de tester l'activité de ce promoteur en réponse à une production d'éthylène lors de la blessure, une série d'essais a été réalisée en condition de blessure avec ou sans traitement à l'éthylène ou de son dérivé, le 1-MCP, capable de bloquer les récepteurs de l'éthylène. Les résultats obtenus ont montré que l'expression de gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur *AAT* ne semble pas être dépendante de l'éthylène. En effet, le MCP n'influe pas sur son profil d'expression (figure II-24). Afin de limiter les effets de la blessure lors des préparations histochimiques, des analyses préliminaires sur des extraits protéiques ont été réalisées à partir de tissus pour une détection colorimétrique utilisant du MUG (4-methyl-umbelliferyl-P-D-glucuronide) comme substrat. Ces analyses ont confirmé les données d'expression constitutive obtenues précédemment sur le fruit et sur la feuille et ne semblent pas être dépendante de la réponse à la blessure ou à l'éthylène (données non montrées).

Le même type de construit a été utilisé chez *Arabidopsis* pour des transformations stables. L'expression n'est pas constitutive contrairement à ce que nous observons pour la tomate (figure II-25). En effet, l'expression du transgène se révèle plus nuancée avec une expression détectable au niveau des trichomes alors que le reste de la feuille est faiblement coloré chez des plantules de deux semaines (figure II-25-A). Cependant, l'expression est plus forte dans les feuilles des plantes adultes (figure II-25-B). De plus, une expression est détectée dans les zones de ramification au niveau de la tige, dans la zone d'abscission et l'extrémité des siliques et des boutons floraux. La réponse à la blessure a été testée mais le construit semble moins réactif chez *Arabidopsis* par rapport à la tomate.



4-Conclusion

Au cours de ce travail, deux promoteurs de tomate ont été isolés, il s'agit des promoteurs des gènes *SIEXP1* et *SIAAT*. Ces deux gènes sont exprimés préférentiellement dans le fruit et présentent un pic d'expression pendant la maturation. Ces données d'expression sont bien corrélées avec l'activité des protéines correspondantes. En effet, *SIEXP1* est impliqué dans le relâchement des parois cellulaires et *SIAAT* participe à la synthèse des arômes du fruit au cours de la maturation du fruit.

L'utilisation des promoteurs natifs *SIAAT* et *SIEXP1* ne permet pas de visualiser, avec un gène rapporteur, un profil d'expression corrélé au taux d'accumulation des transcrits de la séquence endogène correspondante. L'expression *in planta* de la région promotrice de 1340 pb de *SIEXP1* n'a pas permis d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus, par expression transitoire, dans la thèse de FA Hoebericht (2002). Ce constat souligne les difficultés rencontrées lors de l'étude de l'expression des gènes associés à la maturation du fruit, par des techniques transitoires (biolistique, protoplastes). En effet, ces méthodes de transformation induisent des stress et des phénomènes de perturbation de l'intégrité cellulaire qui peuvent fausser l'interprétation des résultats. Les différences de profils d'expression obtenues avec les séquences promotrices testées, peuvent s'expliquer par l'absence d'éléments régulateurs nécessaires pour la régulation spatio-temporelle *in planta*. Ainsi, la taille des promoteurs testés pourrait être insuffisante car des « boîtes » régulatrices seraient potentiellement présentes dans des régions distales. En effet, des *cis*-éléments peuvent être présent jusqu'à plusieurs milliers de paires de bases du site d'initiation de la transcription. De plus, une vérification par 5'RACE PCR de la longueur du transcrit *SIEXP1* nous a permis de déterminer la partie 5'UTR, celle-ci est d'environ 500 pb. En conséquence, le promoteur utilisé pour les analyses d'expression ne représente qu'environ 850 pb. Cette taille est probablement insuffisante pour la régulation *in planta* de ce gène car certains *cis*-éléments régulateurs se trouvent probablement en amont de la séquence étudiée. Cependant, on peut exclure une hypothèse d'une inhibition de l'expression consécutive à une insertion du transgène dans des régions inactives transcriptionnellement, car l'ensemble des lignées transgéniques testées ont toutes présentées le même niveau d'expression.

Bien que très faible, l'expression du gène rapporteur sous le contrôle du promoteur *SIEXP1* est fruit-spécifique et ce, contrairement à la séquence du promoteur *SIAAT* testée qui est quasiment constitutive. Dans le premier cas, l'expression observée pourrait s'expliquer par

l'absence d'un ou de plusieurs *cis*-éléments activateurs de la transcription. Dans le second, il pourrait s'agir d'une absence d'éléments régulateurs négatifs. Dans les deux cas l'expression ne semble pas dépendante de l'éthylène malgré la présence d'éléments putatifs de réponse à l'éthylène.

Les travaux menés n'ont pas permis de dégager un motif consensus capable à lui seul de conférer une expression fruit-spécifique à un promoteur minimum ou d'interagir spécifiquement avec des facteurs nucléaires extraits de fruits. En revanche chez le melon, un élément fruit-spécifique a été identifié dans le promoteur de la cucumisine¹. Un promoteur synthétique contenant des répétitions de cet élément associé à un promoteur minimum a été capable de diriger l'expression d'un gène rapporteur spécifiquement dans des tissus de fruits par une méthode transitoire mais n'a pas été testé à ce jour *in planta*.

Les difficultés rencontrées pour la caractérisation fonctionnelle des promoteurs et l'absence de résultats pouvant être valorisés sous forme d'une publication, nous ont amené, à réorienté le sujet de thèse vers d'autres acteurs de la régulation transcriptionnelle : les co-activateurs de la transcription. Ces travaux ont été menés sur le gène *SIER24* dont l'expression est fortement induite au cours de la maturation et en réponse à l'éthylène. Ces travaux font l'objet du chapitre suivant.

Chapitre III

Caractérisation d' *ER24*, un co-facteur de transcription de type MBF1 répondant à l'éthylène chez la tomate

1-Introduction

Chez les organismes vivants, l'expression de plusieurs centaines ou milliers de gènes, codant des protéines, est soumise à une régulation temporelle et spatiale très complexe. La première étape dans la régulation transcriptionnelle d'un gène consiste en une intégration de différents signaux conduisant à une modification du niveau de transcription du gène cible. Dans le cas de la maturation des fruits, le signal éthylène, via une chaîne de perception et de transduction, conduit à la stimulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans les voies métaboliques responsables de la mise en place et du déroulement du processus de maturation. La spécificité de l'expression génique est au moins partiellement gouvernée par des activateurs ou répresseurs transcriptionnels qui sont des protéines dont beaucoup agissent en se liant à l'ADN d'une manière séquence-spécifique. Parmi les acteurs protéiques de la transcription, les co-facteurs ont pour rôle d'établir un lien entre les facteurs de transcription généraux qui se lient directement à l'ADN (tels que la TATA Box Binding Protein) et des régulateurs transcriptionnels agissant en *trans* impliqués dans des interactions ADN/protéine ou protéine/protéine. Ainsi, les co-activateurs transcriptionnels sont des composants clés dans la régulation de l'expression car ils établissent des liens entre différents partenaires protéiques. Leur fonction concerne aussi bien le recrutement de protéines régulatrices (activateurs ou répresseurs) que l'établissement d'une structure chromatinienne favorisant ou non la mise en place du complexe activateur de la transcription (Roeder *et al.*, 1991, Li *et al.*, 1994).

Parmi les gènes codant des co-facteurs de transcription, la famille des MBF1 (Multiprotein Bridging Factor 1) est très conservée chez les Eucaryotes. Cette forte conservation de séquence confère à ses membres la capacité de se compléter d'un point de vue fonctionnel (Tsuda *et al.*, 2004). Des gènes de la famille des MBF1 ont été identifiés chez les animaux (notamment le ver à soie, la drosophile et l'homme), chez la levure et chez les plantes (notamment *Arabidopsis thaliana*, la pomme de terre et la tomate). Les MBF1 assurent des fonctions diverses comme par exemple, la régulation de la voie de biosynthèse d'un acide aminé chez la levure (Takemaru *et al.*, 1998), la différenciation cellulaire (Dragoni *et al.*, 1998), le développement du système nerveux central (Liu *et al.*, 2003) chez les animaux et la résistance aux stress biotiques et abiotiques chez les plantes (Suzuki *et al.*, 2005).

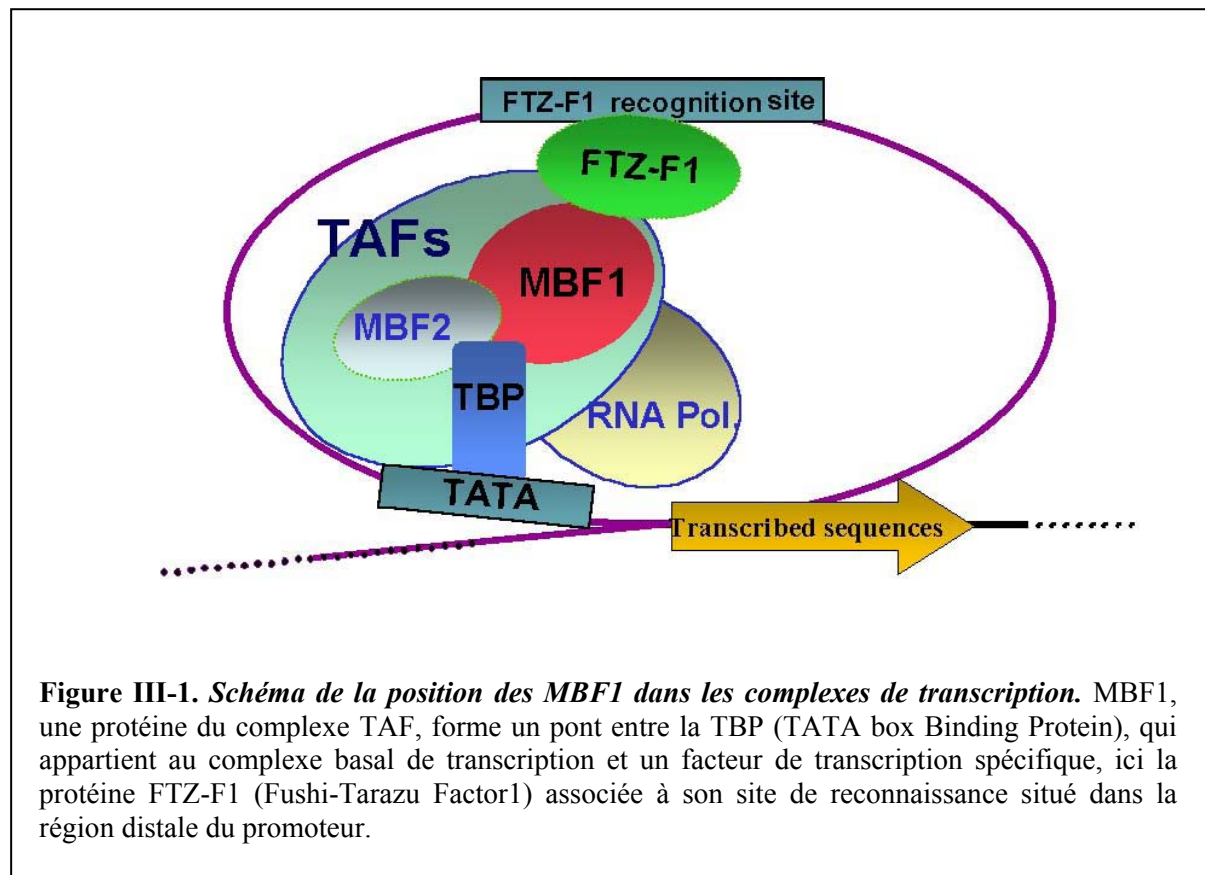
Deux gènes appartenant à cette famille multigénique font l'objet des travaux présentés dans ce chapitre. Il s'agit du gène *SIER24* (Ethylene Responsive 24) de tomate identifié initialement comme un gène de réponse à l'éthylène et de son orthologue chez *Arabidopsis thaliana*, *AtMBF1c*. La première partie de ce chapitre présente les gènes de la famille des MBF1 chez les animaux et chez les plantes. La seconde partie de ce chapitre présente un acte de congrès qui concerne l'isolement des gènes de la famille des MBF1 chez la tomate ainsi que les études concernant leur profil d'expression. La troisième partie du chapitre présente un article accepté dans la revue « Plant Science » relatif à la caractérisation fonctionnelle de *SIER24* et de son orthologue chez *Arabidopsis thaliana*.

1-1 La famille des co-facteurs de transcription de type MBF1 chez la levure et les animaux

La protéine «Multiprotein Bridging Factor 1» (MBF1) a été isolée la première fois à partir de glandes du ver à soie (*Bombyx mori*) (Li *et al.*, 1994). Il s'agit d'une protéine de 146 résidus d'acides aminés impliquée dans le mécanisme de régulation transcriptionnelle. MBF1 n'interagit pas directement avec les séquences promotrices des gènes (Li *et al.*, 1994), mais joue le rôle de pont entre les régulateurs transcriptionnels (contenant un domaine basique / leucine zipper, b-zip) associés à leur *cis*-élément et la TBP liée à sa TATA box, comme représenté (figure III-1). Les protéines MBF1 ont un domaine « hélice-tour-hélice » (HTH), retrouvé sur les facteurs de transcription allant des bactéries aux eucaryotes et qui constitue de ce fait, un mode de régulation transcriptionnelle conservé au cours de l'évolution (Aravind *et al.*, 1999).

MBF1 a été identifiée chez la drosophile comme une protéine interagissant avec la protéine FTZ-F1 (Fushi Tarazu Facteur1) qui est un récepteur nucléaire monomérique se liant directement à l'ADN (Li *et al.*, 1994). Des essais de délétions sur *Bm*MBF1 et *Hs*MBF1 ont montré que la partie centrale de la protéine (résidus 35 à 113) est importante pour l'interaction avec la protéine MBF2, un co-facteur isolé en même temps que MBF1, ainsi que pour la liaison avec la TBP. La substitution du résidu acide aspartique 112 par une alanine chez *Sc*MBF1 (D112A) entraîne une réduction importante de l'affinité de MBF1 envers la TBP *in vitro* (Takemaru *et al.*, 1998). De plus, des études de mutagenèse de MBF1 chez la levure (Takemaru *et al.*, 1998) ont permis de démontrer que l'acide aminé à la position 112 doit nécessairement être occupé par un résidu acide pour que la protéine soit active. Cette partie centrale est remarquablement conservée dans toutes les MBF1 connues (Takemaru *et al.*, 1997 ; Kabe *et al.*, 1999). Des études de structure par RMN ont montré la présence de quatre hélices amphipathiques compactes dans la partie centrale de la protéine (résidus 63 à 132). Il est donc possible que cette partie soit impliquée dans des interactions protéine-protéine. Chez la levure, MBF1 a été initialement décrit comme un partenaire protéique du facteur de transcription GCN4 impliqué dans l'activation de la transcription du gène *HIS3*, codant une enzyme de la voie de biosynthèse de l'histidine. MBF1 permet l'activation de l'expression de *HIS3* en formant un pont entre GCN4 et la TBP (Takemaru *et al.*, 1998). Chez la levure, il a été également montré par double hybride que *Sc*MBF1 interagit avec des protéines impliquées

dans divers processus physiologiques comme l'exocytose, le transport vésiculaire, la réponse au stress et la dégradation par le protéasome (Mayordomo et Sanz, 2002).



Chez l'Homme, la première MBF1 décrite est la protéine EDF-1 (Endothelial Differentiation Factor) qui est impliquée dans la différenciation des cellules endothéliales (Dragoni *et al.*, 1998). La protéine EDF-1 ou HsMBF1 interagit *in vivo* et *in vitro* avec la calmoduline (CaM) qui est la principale protéine réceptrice de Ca²⁺ dans la cellule. Ainsi, EDF-1 est impliqué dans deux types d'interactions, la première dans le cytosol avec la CaM et la deuxième, comme co-facteur de la transcription en liaison avec la TBP tout comme chez la levure (Mariotti *et al.*, 2000). HsMBF1 a aussi été étudiée pour son interaction avec le récepteur nucléaire Ad4BP/SF-1 (Adrenal 4-Binding Protein/ Steroidogenic Factor-1), un facteur de transcription qui joue un rôle important dans l'établissement de la fonction reproductive et dont la séquence est homologue à celle de FTZ-F1 (Kabe *et al.*, 1999). HsMBF1 stimule l'interaction des récepteurs nucléaires associés au métabolisme de lipides (LXR α , PPAR γ et LRH-1). La plupart des protéines partenaires de MBF1 décrites à ce jour ont un domaine b-ZIP. Les protéines LXR α et PPAR γ ne contiennent pas ce domaine mais sont toutefois capable de se lier avec MBF1 (Brendel *et al.*, 2002). Chez les humains on

trouve deux isoformes de *HsMBF1*, la première *HsMBF1 α* s'exprime dans tous les tissus, contrairement à la seconde *HsMBF1 β* qui s'exprime uniquement dans le pancréas. Toutes deux ont la capacité de se lier à la TBP et de stimuler *in vitro* la transcription de gènes cibles (Kabe *et al.*, 1999). Chez le rat, MBF1 est nécessaire pour l'induction de l'hypertrophie cardiaque induite par la phenyléphrine (PE). *MmMBF1* intensifie l'expression d'un gène marqueur de l'hypertrophie et fonctionne comme un co-activateur transcriptionnel de C-Jun (Busk *et al.*, 2003).

Chez la *Drosophile*, il a été démontré durant le développement du système nerveux central que *DmMBF1* forme un pont entre un facteur de transcription appelé Tracheae Defective Factor (TDF), qui contient un domaine b-zip et la TBP (Liu *et al.*, 2003). La déficience pour cette protéine TDF est létale chez les embryons et en absence de MBF1 sa transcription est diminuée mais n'est pas nulle (Liu *et al.*, 2003). Toujours chez la *Drosophile*, il a été montré que MBF1 interagit directement avec le facteur de transcription D-Jun impliqué dans la régulation de processus comme l'apoptose, la différenciation et la mobilisation de défenses contre les stress (Shaulian and Karin, 2002). Ainsi, des drosophiles déficientes en MBF1 sont plus sensibles aux stress oxydatifs (Jindra *et al.*, 2004). Les protéines MBF1 chez les animaux, sont localisées dans le cytoplasme mais, des études de co-immunoprécipitation de MBF1 et D-Jun suggèrent que MBF1 migre vers le noyau avec D-Jun (Jindra *et al.*, 2004) ou avec d4BP/SF-1 chez l'humain (Kabe *et al.*, 1999).

1-2 La famille des co-facteurs de transcription de type MBF1 chez les plantes supérieures

SlER24 est le premier gène codant une protéine de type MBF1 identifié chez les plantes. Il a été initialement isolé comme un gène de réponse à l'éthylène chez la tomate (Zegzouti *et al.*, 1999). Par la suite, il a été montré que *StMBF1* est positivement régulée chez la pomme de terre durant l'attaque par *Fusarium solani. sp. eumartii*. L'accumulation du messenger est également stimulée par la blessure, par un traitement avec un éliciteur de champignon, par l'acide salicylique et par l'éthylène (Godoy *et al.*, 2001). *StMBF1* est phosphorylée dans sa partie centrale (résidus 71-117) ce qui constitue un mécanisme de régulation positive en réponse à des éliciteurs fongiques. Des études plus récentes suggèrent qu'une sérine/thréonine kinase dépendante du calcium est responsable de la phosphorylation de la protéine *StMBF1* (Zanetti *et al.*, 2003).

La protéine virale MP (Movement Protein) du virus de la mosaïque de la tomate (ToMB), interagit avec les MBF1 de tabac et d'*Arabidopsis*. La protéine MP s'associe à l'ADN viral et interagit avec une variété de protéines de l'hôte en modulant l'expression de différents gènes de la plante. L'hypothèse que l'interaction entre MBF1 et MP participerait à la suppression des mécanismes de défense de la plante a été avancée (Matsushita *et al.*, 2002). Chez la plante modèle *Arabidopsis* MBF1 appartient à une famille multigénique de trois membres (Tsuda *et al.*, 2004). Les gènes *AtMBF1a* et *AtMBF1b* sont constitués de quatre exons et trois introns alors que *AtMBF1c* est dépourvu d'introns (Tsuda *et al.*, 2004). L'expression de chacun des gènes d'*Arabidopsis* a été étudiée en utilisant des fusions promoteur-GUS (β -Glucuronidase). Pour *AtMBF1a::GUS* une légère coloration a été observée dans les tissus végétatifs, au niveau des anthères et dans quelques graines. Pour *AtMBF1b::GUS* une forte coloration a été détectée dans le système vasculaire, les feuilles, les pétioles, la tige, les anthères et quelques graines. Aucune coloration associée à *AtMBF1c::GUS* n'a été détectée dans les premiers stades du développement mais, chez les plantes adultes, l'expression a été observée dans les feuilles, la tige, la fleur, les anthères et les siliques mais pas dans les graines. Le fait que les trois *AtMBF1* s'expriment dans les anthères peut suggérer une participation de ces protéines à la formation du pollen (Tsuda et Yamazaki, 2004). Une protéine homologue à *SlER24* a été identifiée chez *Retama raetam*, une plante commune dans les écosystèmes arides qui entourent la Méditerranée. Cette plante utilise comme stratégie d'acclimatation une dormance partielle pour résister aux longues périodes de sécheresse (Mittler, 2001). Le gène *RrER24* est induit dans la journée durant les périodes de température élevée tandis que le niveau du messenger diminue durant la nuit lorsque la température baisse. L'induction du messenger se produit aussi après un choc thermique consistant en un traitement à 45°C pendant 5 h. Ces résultats suggèrent l'implication de ce gène dans la réponse aux stress environnementaux et en particulier les chocs thermiques (Pnueli *et al.*, 2002). Chez le tabac on observe une induction de l'homologue du gène *SlER24* après un stress hydrique ou chaleur ou la combinaison des deux (Rizhsky *et al.*, 2002).

Une analyse du transcriptome par *microarrays* chez *Arabidopsis* a mis en évidence une augmentation du messenger du gène homologue à *SlER24*, *AtMBF1c*, par une combinaison de stress hydrique et de stress chaleur (Rizhsky *et al.*, 2004). D'autres travaux montrent que les arabettes présentent une accumulation de transcrits *AtMBF1c* après un traitement ABA (Tsuda *et al.*, 2004), un stress osmotique (Tsuda et Yamazaki, 2004), un stress hydrique ou chaleur (Rizhsky *et al.*, 2004). Mais le froid n'a apparemment pas d'effet sur l'expression de *AtMBF1c* (Tsuda and Yamazaki, 2004). En revanche, l'expression d'*AtMBF1a* et *AtMBF1b*

présente un profil constitutif et ne montre pas de variation significative en réponse à différents traitements ou en réponse aux stress biotiques (Tsuda et Yamazaki, 2004). Ces données suggèrent fortement une implication d'*AtMBF1c* dans la réponse aux stress. D'ailleurs, il a été montré que la surexpression d'*AtMBF1c* confère aux plantes transgéniques une tolérance accrue au stress thermique et osmotique (Suzuki *et al.*, 2005). Les auteurs ont pu montrer par des analyses *microarrays* que la surexpression d'*AtMBF1c* favorise l'accumulation des transcrits des gènes de réponse aux stress tels que les gènes *PR* (Pathogenesis-Related) lors de stress thermiques et osmotiques (Suzuki *et al.*, 2005). Des études sur une protéine MBF1 de la pomme de terre montrent une augmentation de son expression en réponse aux stress chaleur et osmotique (Arce *et al.*, 2006), mais aussi en réponse à la blessure et aux attaques de pathogène (Zanetti *et al.*, 2003). A ce jour, aucun mutant perte-de-fonction n'a été décrit pour les gènes de la famille des MBF1 chez les plantes.

2- Characterization of tomato Sl-MBF1 transcriptional co-activator gene family.

Avant-propos:

Le travail présenté dans cet acte de congrès, auquel j'ai participé, a été initié au laboratoire par deux des co-auteurs Fabiola Jaimes-Miranda et Maité Sanchez-Ballesta. Il concerne l'isolement et les analyses d'expression des MBF1 chez la tomate. Les résultats obtenus ont permis d'orienter la suite des travaux vers la caractérisation de *SIER24* qui est le membre le plus divergeant de la famille des co-facteurs MBF1, de par sa structure et son profil d'expression.

2-1 Introduction

Les régulateurs de la transcription de la famille des MBF1 ont été précédemment décrits comme des éléments clés du contrôle de la machinerie de transcription. Le premier co-activateur de la transcription de type MBF1 appelé *SIER24* a été initialement identifié chez la tomate. Nous décrivons ici l'isolement de trois nouveaux membres de cette famille ainsi que la caractérisation de cette famille multigénique (*SIMBF1a*, *SIMBF1b*, *SIMBF1c*, *SIER24*). L'isolement de clones pleine longueur indique que *SIER24*, *SIMBF1a*, *SIMBF1b* et *SIMBF1c* codent pour des protéines de respectivement, 16.1 kDa, 15.3 kDa, 15.3 kDa et 15.4 kDa. L'alignement des séquences a révélé une grande conservation entre les protéines déduites de *SIMBF1a*, *SIMBF1b* et *SIMBF1c* avec une similarité allant de 92 à plus de 98%. *SIMBF1/ER24* est significativement divergent et présente une homologie de 43.5 à 44.2% et une similarité de 61.9 à 62.6% avec les trois autres MBF de tomate au niveau protéique. L'arbre phylogénétique montre que les protéines MBF1 de plantes ségrègent en deux groupes distincts. *SIMBF1a*, *SIMBF1b* et *MBF1c* se retrouvent dans le même groupe alors que *SIER24* est situé dans un groupe différent, confirmant ainsi que chez différentes plantes les protéines de type *SIER24* présentent des particularités de séquences divergentes par rapport aux autres MBF1.

La fonctionnalité des 4 gènes a été testée par complémentation d'un mutant de levure *Ambf1* (KT131) muté pour le gène *yMBF1*. Les 4 gènes *MBF1* de tomate sont capables de

2-2 Acte de congrès

Characterization of tomato *SI-MBF1* transcriptional co-activator gene family

Sanchez-Ballesta M.T., Hommel M., Jaimes-Miranda F., Tournier B., Zegzouti H., Mila I., Latche A., Pech J.C., Bouzayen M. and Regad F. *

Laboratoire de Génomique et Biotechnologie des Fruits INRA/INP-ENSAT UMR990, Castanet-Tolosan, F31326, France. (*Corresponding author: regad@ensat.fr)

1. Introduction

The regulation of eukaryotic gene activity at the transcriptional level involves multiprotein complexes and requires the concerted action of transcription factors and coactivator proteins. Transcription factors bind to DNA in a sequence-specific manner and essentially mark a gene for activation or repression through the recruitment of coactivator or corepressor proteins [1]. Coactivators are proteins that connect a trans-acting factor with a component of the basal transcription machinery allowing transcriptional activation to proceed [2; 3]. Initially, multiprotein bridging factor 1 (MBF1) genes were identified in *Bombyx mori* as coactivators [2] and thereafter shown to contribute with other proteins to the building of TAF complexes (TATA box protein Associated Factors) that are essential for transcriptional initiation. MBF1 proteins recruit the basal transcription machinery to specific transcription factors bound to their target promoters [4]. It is quite clear now that transcriptional regulation at the level of coactivators is a substantial part of the mechanisms underlying the control of gene expression and that coactivators allow functional integration of transcription factors from different types [1].

We have cloned the first plant MBF1-like gene (named ER24) on the basis of its regulation by the plant hormone ethylene in tomato fruit. In addition this gene was shown to be induced during fruit ripening [5]. Three stress-regulated MBF1 genes were subsequently identified in *Arabidopsis thaliana* and their encoded proteins were able to functionally complement the MBF1 yeast mutant and to bridge TBP and the yeast transcriptional activator involved in amino acids and purines biosynthesis (GCN4) *in vitro* [6]. It was also reported that ER24-like genes were up-regulated by heat shock treatment in *Retama raetam* [7] and by drought and heat shock in tobacco and *Arabidopsis* [8; 9]. Direct evidence of the involvement of MBF1 in plant responses to environmental stresses came from ectopic expression of the MBF1c gene which resulted in enhancing tolerance of the transgenic *Arabidopsis* lines to heat and osmotic stresses [10]. These

370 Sanchez- Ballesta et al.

data suggest that MBF1-like genes may represent primary targets of physiological signals associated with a variety of plant developmental processes.

We describe in here the isolation and characterization of three new members of the MBF1 gene family in the tomato. Like SI-ER24, the remaining tomato MBF1 genes, encode functional transcriptional coactivators as demonstrated by complementation assays of the MBF1-disruptant *S. cerevisiae* strain ($\Delta mbf1$). Detailed expression studies revealed a distinct pattern of expression for SI-ER24 compared to other MBF1-like genes, suggesting a specific role for ER24 in ethylene responses and in fruit ripening.

2 Materials and methods

2.1 Plant material and treatments

Solanum Lycopersicum (Ailsa Craig) plants were grown in soil under standard greenhouse conditions. Late immature green fruit, unable to produce ripening-related ethylene, were harvested and treated either with ethylene (50 $\mu\text{L.l}^{-1}$) for 15 min, 1 h and 6 h, or with air. Samples corresponding to treated and untreated fruit, flowers, roots, leaves and stem were harvested for RNA extraction.

2.2 Isolation of tomato genomic clones

Genomic DNA was extracted from tomato leaves by a CTAB method. Genomic clones were isolated by PCR amplification and the amplified fragments were cloned into pGEM-T easy vector (Promega) and fully sequenced. Comparative analysis between the genomic clone and the corresponding cDNA sequences allowed introns and exons delimitation.

2.3 Functional complementation of yeast mutant strains

SI-MBF1a-c and SI-ER24 ORFs were cloned into the pYES TOPO vector and expressed in the $\Delta mbf1$ mutant strain.

2.4 Expression analyses by Quantitative RT-PCR

Real-time quantitative PCR was performed using SYBR GREEN PCR Master Mix. To determine relative fold differences for each sample in each experiment, the Ct value for SI-ER24, SI-MBF1a, SI-MBF1b and SI-

MBF1c genes was normalized to the Ct value for Sl-Actin-51 a constitutive reference gene and was calculated relative to a calibrator using the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3 Results and Discussion

3.1 Tomato MBF1 are encoded by a small multigene family

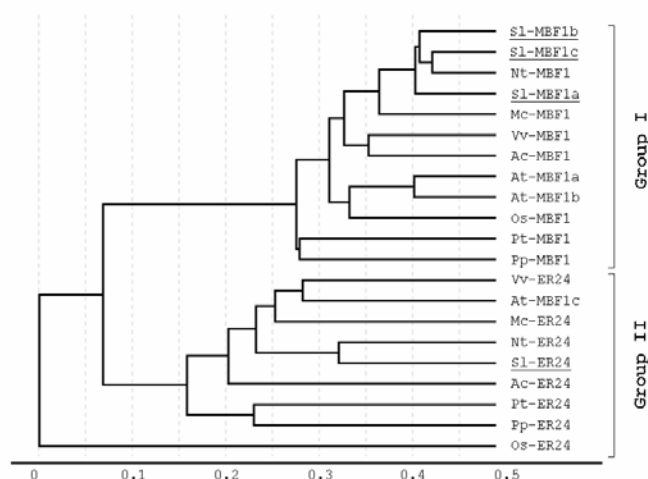


Fig. 1. Phylogenetic tree of plant MBF1s. Group I: Sl-MBF1a, Sl-MBF1b, Sl-MBF1c (*S. lycopersicum*), Nt-MBF1 (*N. tabacum*), Mc-MBF1 (*M. crystallinum*), Vv-MBF1 (*V. vinifera*), Ac-MBF1 (*A. cepa*), At-MBF1a, At-MBF1b (*A. thaliana*), Pt-MBF1 (*P. taeda*), Pp-MBF1 (*P. patens*). Group II: Vv-ER24, At-MBF1c, Mc-ER24, Nt-ER24, Sl-ER24, Ac-ER24, Pt-ER24, Pp-ER24. Members of the tomato MBF1 family are underlined.

SI-ER24, SI-MBF1a, SI-MBF1b and SI-MBF1c full-length cDNA clones encode putative proteins of 16.1 kDa, 15.3 kDa, 15.3 kDa and 15.4 kDa, respectively. High degree of sequence conservation was found between SI-MBF1a, SI-MBF1b and SI-MBF1c deduced proteins ranging from 92.1 to 94.3% homology and 96.4 to 98.6% similarity. By contrast, SI-ER24 derived protein displays no more than 44.2% homology and 62.6% similarity with the remaining tomato MBF1 proteins. Phylogenetic analyses indicate that tomato MBF1 genes are divided in two distinct groups, SI-MBF1a, b and c belong to the same group while SI-ER24 lies in a separate clade (Fig. 1).

3.2 Structure analysis of tomato MBF1 genomic clones

The genomic structure of MBF1 genes is remarkably conserved between Arabidopsis and tomato except for the size of the introns that are significantly larger in the tomato genes. SI-ER24 and its putative Arabidopsis ortholog (At-MBF1c) are highly divergent from the remaining members of the multigene family and exhibit an intronless genomic structure (Fig. 2).

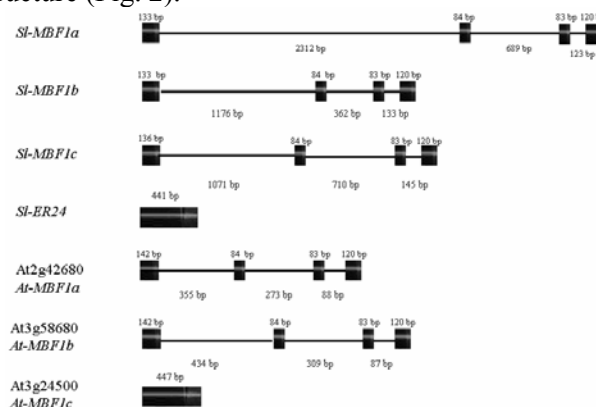


Fig. 2. Comparison of exon/intron structure of tomato and Arabidopsis MBF1 genes. Black boxes represent exons and lines connecting boxes denote introns. Numbers indicate intron and exon sizes in bp.

3.3 Tomato MBF1 gene family encodes functional transcriptional co-activators

A complementation test of yeast MBF1 mutation was used to assess the ability of the tomato MBF1 genes to function as transcriptional co-activators. Yeast $\Delta mbf1$ strain was transformed with each of the tomato

MBF1 cDNAs [12]. The ability of the tomato MBF1 genes to complement the yeast MBF1-disrupted strain reveals that all four tomato MBF1 genes encode functional transcriptional co-activator and indicates that the mechanism by which MBF1 proteins regulate transcription is well conserved among eukaryotic organisms from yeast to higher plants (data not shown).

3.4 Members of the tomato MBF1 gene family show distinct expression patterns

While *Sl-ER24*, *Sl-MBF1a*, *Sl-MBF1b* and *Sl-MBF1c* transcripts are detected in all tissues tested, *Sl-ER24* and *Sl-MBF1a* show the most contrasted tissue-specific variation (Fig. 3). *Sl-MBF1b* transcripts are the most abundant in all tissues tested except in ripening fruit where *Sl-ER24* transcripts display slightly higher accumulation levels. *Sl-ER24* transcript accumulation is highest in ripening fruit and lowest in the stem whereas *Sl-MBF1a* transcripts accumulate preferentially in roots. *Sl-ER24* is preferentially expressed in fruit and shows the weakest expression in leaves. The specific expression pattern of tomato MBF1 genes is indicative of distinct roles for the encoded proteins.

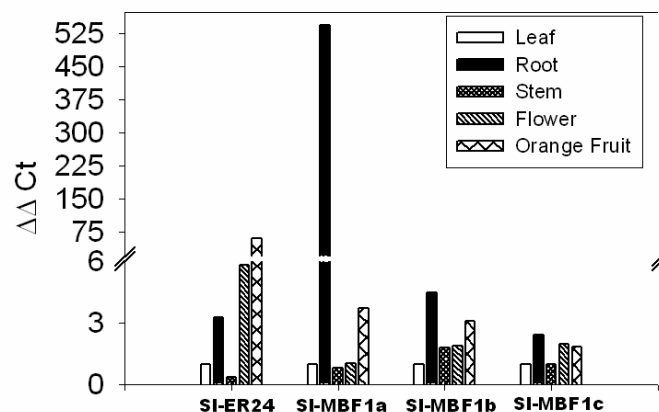


Fig. 3. Tissue-specific expression of tomato MBF1 genes. The levels of *Sl-ER24*, *Sl-MBF1a*, *Sl-MBF1b* and *Sl-MBF1c* transcripts were assessed by real-time quantitative PCR using total RNAs isolated from leaves, root, stem, flower and orange fruit (65 dpa). $\Delta\Delta C_t$ refers to the fold difference in each *Sl-MBF1* expression relative to the leaf taken as a reference sample.

3.5 *Sl-ER24* is highly induced during fruit ripening

While *Sl-MBF1a-c* show either weak or no regulation during fruit ripening *Sl-ER24* displays a clear ripening-associated regulation that is strongly impaired in the tomato ripening mutants *nor*, *rin* and *Nr* (Fig. 4). Moreover, the expression of *Sl-ER24* was found to be transiently up-regulated upon ethylene treatment in immature green fruit where endogenous ethylene production is very low (data not shown). These data studies strongly suggest that *Sl-ER24* could be involved in fruit development and ripening.

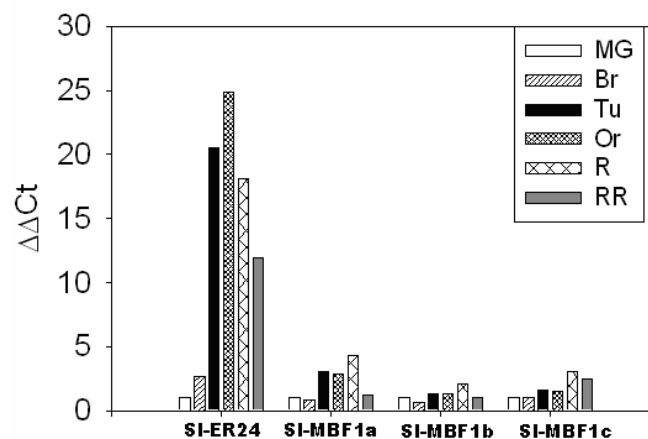


Fig. 4. Ripening-associated expression of tomato MBF1 genes. A: Transcript accumulation of *Sl-ER24*, *Sl-MBF1a*, *Sl-MBF1b* and *Sl-MBF1c* genes during tomato fruit ripening. Mature green fruit (MG, 43 dpa); breaker fruit (Br, 53 dpa), turning fruit (Tu, 60 dpa); orange fruit (Or, 65 dpa); red fruit (R, 69 dpa) and red ripe fruit (RR, 76 dpa).

References

1. Spiegelman, B.M. and Heinrich, R. 2004. Biological control through regulated transcriptional co-activators. *Cell* 119: 157-167.
2. Roeder, R.G. 1991. The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem. Sci.* 16: 402-408.
3. Li, F.Q., Ueda, H. and Hirose, S. 1994. Mediators of activation of fushi tarazu gene transcription by BmFTZ-F1. *Mol. Cell Biol.* 14: 3013-3021
4. Naar, A.M., Lemon, B.D. and Tjian, R. 2001. Transcriptional co-activator complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 475-501.

5. Zegzouti, H., Jones, B., Frasse, P., Marty, C., Maitre, B., Latché, A., Pech, J.C. and Bouzayen, M. 1999. Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display. *Plant J.* 18: 589-600.
6. Tsuda, K., Tsuji, T., Hirose, S. and Yamazaki, K. 2004. Three Arabidopsis MBF1 homologs with distinct expression profiles play roles as transcriptional co-activators. *Plant Cell Physiol.* 45: 225-231.
7. Pnueli, L., Hallak-Herr, E., Rozenberg, M., Cohen, M., Goloubinoff, P., Kaplan, A. and Mittler, R. 2002. Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *Plant J.* 31: 319-30.
8. Rizhsky, L., Liang, H. and Mittler, R. 2002. The combined effect of drought stress and heat-shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* 130: 1143-1151.
9. Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S. and Mittler, R. 2004. When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol.* 134: 1683-1696.
10. Suzuki, N., Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V. and Mittler, R. 2005. Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional co-activator multiprotein bridging factor 1c. *Plant Physiol.* 139: 1313-1322.
11. Tournier, B., Sanchez-Ballesta, M.T., Jones, B., Pesquet, E., Regad, F., Latche, A., Pech, J.C. and Bouzayen, M. 2003. New members of the tomato ERF family show specific expression pattern and diverse DNA-binding capacity to the GCC box element. *FEBS Lett.* 550: 149-154.
12. Takemaru, K., Harashima, S., Ueda, H. and Hirose, S. 1998. Yeast co-activator MBF1 mediates GCN4-dependent transcriptional activation. *Mol. Cell Biol.* 18: 4971-4976.
- Abel, S., Theologis, A. 1994. Transient transformation of Arabidopsis leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. *Plant J.* 5: 421-427.

2-3 Conclusion

Les analyses phylogénétiques et la détermination des profils d'expression des quatre gènes appartenant à la famille des MBF1 chez la tomate, suggèrent un rôle spécifique pour *SIER24* dans la réponse à l'éthylène et aux stress abiotiques ainsi que dans la maturation du fruit. En effet celui-ci présente la séquence protéique la plus divergente de la famille et une structure génique particulière qui nous permet de le classer dans le groupe II. Dans ce groupe est présent également *AtMBF1c* sont orthologue, qui est impliqué dans la réponse de la plante aux stress biotiques et abiotiques (Suzuki *et al.*, 2005). *SIER24* se révèle être un acteur potentiel dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans les processus de tolérance et de résistance aux stress biotique et abiotiques. Il pourrait être également impliqué dans la régulation de processus de maturation. Ces processus sont connus pour être en partie régulés par l'éthylène, or l'expression de *SIER24* est fortement induite par l'éthylène. C'est pourquoi, ce gène pourrait jouer un rôle clé dans la régulation de ces mêmes processus via la réponse à l'éthylène.

Ainsi, à la suite de ces travaux, nous avons poursuivi la caractérisation fonctionnelle de *SIER24*. Les résultats obtenus font l'objet du paragraphe suivant qui présente un article décrivant la caractérisation fonctionnelle, par une stratégie de « *silencing* », de ce gène et de son homologue *AtMBF1c* chez *Arabidopsis*. Les résultats obtenus permettent de définir de nouvelles fonctions pour les MBF1 de plantes.

3- Over-expression of a chimeric gene of the transcriptional co-activator MBF1 fused to the EAR repressor motif causes developmental alteration in *Arabidopsis* and tomato.

3-1 Introduction

Plusieurs tentatives visant à réprimer l'expression des gènes MBF1 chez la tomate ont été entreprises au sein du laboratoire. Ainsi une stratégie anti-sens a été mise en œuvre pour comprendre le rôle de *SIMBF1/ER24* mais n'a pas conduit à l'obtention de lignées transgéniques affectées dans son expression. Par la suite la technique de « *Virus Induced Gene Silencing* » (VIGS) a été utilisée mais n'a pas non plus permis d'obtenir une diminution significative des transcrits MBF1 (conf résultats complémentaires). Cette impossibilité à obtenir des mutants perte-de-fonction est probablement liée à la redondance fonctionnelle des ces gènes et/ou à un phénotype létal. C'est pourquoi, l'utilisation d'une technique dont le but est d'altérer efficacement la fonction de gènes cibles tout en étant effective pour les familles multigéniques à forte redondance fonctionnelle a été envisagée. Il s'agit de la méthodologie appelée « Chimeric Repressor Silencing-Technology » (CRES-T) exploitant le domaine de répression transcriptionnel EAR (ERF-associated Amphiphilic Repression). Ce domaine a été isolé à partir de facteurs de transcription répresseurs de la famille des ERF (Ethylene Responsive Factor) d'*Arabidopsis* (Hiratsu, 2003). La stratégie CRES-T consiste à générer des plantes transgéniques produisant une protéine recombinante associant un facteur de transcription cible à une séquence de type EAR-like. L'expression constitutive de la protéine recombinante conduit à une perte de fonction dominante du gène cible. Cette méthodologie est utilisée chez *Arabidopsis* pour l'analyse fonctionnelle de facteurs de transcription redondants mais aussi pour visualiser l'effet d'une répression des gènes régulés spécifiquement par ces facteurs de transcription (Matsui *et al.*, 2005; Takase *et al.*, 2007).

Dans cette publication nous démontrons tout d'abord par un système de transformation transitoire que la fusion du domaine répresseur EAR avec un co-activateur de type MBF1 peut conduire à l'inhibition de l'expression d'un promoteur synthétique de réponse à

l'éthylène. La même protéine recombinante surexprimée dans des lignées transgéniques de tomate et d'*Arabidopsis* conduit à une altération du développement.



Over-expression of a chimeric gene of the transcriptional co-activator MBF1 fused to the EAR repressor motif causes developmental alteration in *Arabidopsis* and tomato

M. Hommel^a, Q. Khalil-Ahmad^a, F. Jaimes-Miranda^a, I. Mila^a,
C. Pouzet^b, A. Latché^a, J.C. Pech^a, M. Bouzayen^a, F. Regad^{a,*}

^a UMR990 INRA/INP-ENSAT “Génomique et Biotechnologie des Fruits”, Pôle de Biotechnologie Végétale,
18 chemin de Borde-Rouge, BP107, 31326 Castanet-Tolosan, France

^b IFR40, Pôle de Biotechnologie Végétale, Chemin de Borde rouge BP17, 31326 Castanet-Tolosan, France

Received 24 October 2007; received in revised form 21 January 2008; accepted 22 January 2008

Abstract

Transcriptional co-activators of the Multiprotein Bridging Factor1 (MBF1) type belong to a multigenic family that encode key components of the machinery controlling gene expression by communicating between transcription factors and the basal transcription machinery. Knocking-down the expression of one member of the family has proved difficult probably due to functional redundancy. We show here that a fusion of *SIER24*, an *MBF1* type gene of tomato, to the Ethylene-responsive element-binding associated Amphiphilic Repression (EAR) motif is capable of slowing down significantly the expression of the GFP protein driven by a synthetic ethylene-responsive GCC-rich promoter in a single cell transient expression system. A fusion of *AtMBF1c* of *Arabidopsis* to *EAR*, driven by the 35S promoter, caused a reduction of the percentage of seed germination and dwarfism of the plant. Similar fusion with the *SIER24* of tomato in the MicroTom cultivar induced a delay of seed germination and no obvious effect on plant growth. Besides giving information on the role of the *MBF1* genes in plant development, this study demonstrates that the EAR strategy is efficient not only for regular transcription factors as demonstrated so far, but also in the case of co-activators known to not bind directly to DNA.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Tomato; *Arabidopsis*; Multiprotein Bridging Factor1; EAR repressor motif; Seed germination; Plant dwarfism

1. Introduction

Transcriptional regulatory proteins play a central role in the expression of genome information during complex biological processes by integrating environmental and cellular signals. Among these proteins, transcriptional co-activators are key components of eukaryotic gene expression by communicating between transcription factors and/or other regulatory elements and the basal transcription machinery [1,2]. The highly conserved Multiprotein Bridging Factors 1 (MBF1) were first identified as co-activators in the silkworm *Bombyx mori* [2] and were shown to contribute with other proteins to the building of TAF complexes (TATA box protein Associated Factors) that are

essential for transcriptional initiation. MBF1s mediate this transcriptional activation by bridging the general factor TBP (TATA box Binding Protein) and specific transcription factors bound to their target promoters [2–7].

The first plant *MBF1-like* gene, named *SIER24*, was identified on the basis of its ethylene responsiveness in tomato fruit and shown to be induced during fruit ripening [8]. Three stress-regulated *MBF1* genes were identified in *Arabidopsis* and the encoded proteins were shown to be able to bridge, *in vitro*, TBP and to functionally complement the MBF1 deficiency in yeast [9]. Moreover, it was reported that *ER24-like* genes in plants were induced by drought, heat shock, osmotic stress, pathogen attack, oxidative stress, wounding and in response to ethylene and salicylic acid (SA) treatments [10–14]. Direct evidence of the involvement of MBF1 in plant responses to environmental stresses was obtained by enhancing tolerance to heat and osmotic stresses in transgenic *Arabidopsis*

* Corresponding author. Tel.: +33 562193566; fax: +33 562193573.

E-mail address: regad@ensat.fr (F. Regad).

lines expressing the *AtMBF1c* gene and more recently *AtMBF1a* [11,14]. These data indicate that *MBF1-like* genes can be associated with a variety of developmental processes in plants such as environmental stress tolerance and suggest that they may represent primary targets of physiological signals.

In tomato, *SIMBF1* is encoded by a multigene family of four members (*SIMBF1a-c* and *SIER24*) in which *SIER24* is the most divergent one. Tomato *MBF1-like* genes as well as *SIER24*, encode functional transcriptional co-activators as demonstrated by their capacity to complement yeast *mbf1* mutant and expression studies revealed a distinct pattern of expression for *SIER24* compared to other *MBF1-like* genes, suggesting a specific role for *SIER24* in ethylene and abiotic stress responses and in fruit ripening (unpublished data). Attempts to knock-out the function of *MBF1* genes in tomato have been so far unsuccessful, probably due to the functional redundancy of this type of transcriptional co-activator.

In plants, chimeric repressors in which transcription factor is fused to a repressor domain have been used successfully for targeted dominant repression of the expression of genes of interest [15–17]. So far, the repressive activity has not been demonstrated for transcriptional co-activators. In order to test whether a dominant repressor domain could overcome the gene redundancy of the *MBF1* family, the Ethylene-responsive element-binding factor associated Amphiphilic Repression (EAR) motif was fused to *SIER24* and its *Arabidopsis* ortholog *AtMBF1c* under the control of cauliflower mosaic virus 35S promoter. In this paper, we present the resultant loss-of-function phenotypes induced by the repressor domain including alteration of seed germination and plant dwarfism.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and growth conditions

Tomato (*Solanum lycopersicum*, cv MicroTom) and *Arabidopsis thaliana* (Wassilewskija ecotype) plants were grown in a culture chamber under the following conditions: 14 h day/10 h night cycle, 25/28 °C day/night temperature for tomato and 20/25 °C day/night temperature for *Arabidopsis*, 80% humidity, 250 mmol m⁻² s⁻¹ light intensity.

2.2. Plasmid construct

The coding sequences of *SIER24* and *AtMBF1c* without stop codon were PCR-amplified (ISIS polymerase, Qbiogene, Illkirch, France) from respectively tomato cDNA, *Arabidopsis* cDNA. Amplifications were performed with forward (5'-AT-GCCGAGCGACCAACAGGGGG3') and reverse (5'-TGA-CTTGTGAATTTTACCTCTAAG3') primers for *SIER24*, forward (5'-ATGCCGAGCAGATACCCAGGAGC3') and reverse (5'-TTTCCCAATTTTACCCCTAAGTTTAAC3') primers for *AtMBF1c*. PCR fragments were ligated into the p35SRDXG vector described by Mitsuda et al. [18] digested with *Sma*I, between the cauliflower mosaic virus 35S promoter and the EAR-motif repression domain SRDX [15]. For plant

stable transformation, SRDX-fusions in entry clones 35S::*SIER24SRDX* and 35S::*AtMBF1cSRDX* were transferred to the pBCKH plant expression vector [18] using the Gateway system (Invitrogen, Carlsbad, CA). For protoplast transformation, *SIER24* complete ORF, *SIER24SRDX* fusion and *SRDX* sequence alone were PCR amplified from respectively, cDNA, 35S::*SIER24SRDX* vector and p35SRDXG vector. Then, PCR products were cloned in *Sma*I digested pGreenII expression vector [19] between the 35S promoter and the Nos terminator to form effector constructs. Vectors, pBCKH and p35SRDXG were kindly provided by Masaru Ohme-Takagi, Gene Function Research Center, AIST, Tsukuba, Japan.

2.3. Expression analyses by semi-quantitative and quantitative RT-PCR

Total RNAs were extracted by the cetyltrimethylammonium bromide method [8]. After quantification, 10 µg of total RNA were treated with DNase I (Promega, Madison, WI, USA) and cleaned up with phenol–chloroform extraction. The reverse transcription reaction was carried out with the Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) using 2 µg of total RNA.

Semi-quantitative RT-PCR was performed to detect the expression of chimeric transgene mRNAs. Polymerase chain reactions were carried out in a GeneAmp[®] PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using ~100 ng of cDNA, 5 pmoles of each oligonucleotide primer, 200 µM of each dNTP, one unit of Taq Polymerase and 1X Taq polymerase buffer in a 20 µl volume. The PCR program initially started with a 95 °C denaturation for 5 min, followed by 28–38 cycles of 95 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 72 °C for 1 min. The PCR samples were submitted to electrophoresis on 2.5% agarose gels in TBE buffer (89 mM Tris-base, pH 7.6, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA). Gels were stained with ethidium bromide (10 µg mL⁻¹) and photographed on top of a 280 nm UV light box. Primers used were the following:

AtMBF1cF 5'TGTTCCCTTTCTCTCAATTCATCG3'
SIER24F 5'CGTTGGCAGTTAATGTAAGAAAGCTAG3'
SRDX_R 5'CTTAAGCGAAACCCAAACGGAGTTC3'

Real-time quantitative PCR was performed using cDNAs corresponding to 2.5 ng of total RNA in a 10 µl reaction volume using SYBR GREEN PCR Master Mix (PE-Applied Biosystems) on an ABI PRISM 7900HT sequence-detection system. *SlActin*-51 (GenBank accession number Q96483) was used as a reference gene with constitutive expression in various tissues. PRIMER EXPRESS software (PE-Applied Biosystems) was used to design gene-specific primers:

AtMBF1aF 5'ACTGATGTAGCAAGTAACAAGAATC3'
AtMBF1aR 5'CAACTATGTGATGAAAAGACC3'
AtMBF1bF 5'AAGTGTAGAACAAAGCTCTTAAAG3'
AtMBF1bR 5'ATAATGACAAAAGGTTCCAAACAGC3'
AtMBF1cF 5'TGTTCCCTTTCTCTCAATTCATCG3'
AtMBF1cR 5'CATTATCAAACAAAACAACAGAC3'
Atβ-tub4F 5'GAGGGAGCCATTGACAAACATCTT3'
Atβ-tub4R 5'GCGAACAGTTCACAGCTATGTTCA3'

SIMBF1aF 5'/CTTTAATCATTGGCTATGTTTTTGCT3'
 SIMBF1aR 5'/CAGAAGAAACACTAATTCAACAGAGAA3'
 SIMBF1bF 5'/GAACGTCTACATCGTTTGGGTCT3'
 SIMBF1bR 5'/CGTCCCGAATCCAGACACA3'
 SIMBF1cF 5'/CAACTTTTTCTGTTAGCCCTCTTTCTAT3'
 SIMBF1cR 5'/ATGTAGCCAGAAATCCAGAACCA3'
 SIER24F 5'/CGTTGGCAGTTAATGTAAGAAAGCTAG3'
 SIER24R 5'/TCCACCGGCAATTTCTCAA3'
 SIActin-51F 5'/TGTCCTATTACGAGGGTTATGC3'
 SIActin-51R 5'/CAGTTAAATCAGACCAGCAAGAT3'

RT-PCR conditions were as follows: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min and one cycle 95 °C for 15 s and 60 °C for 15 s. Samples were run in triplicate in 384-well plates. For each sample, a threshold cycle (Ct) value was calculated from the amplification curves by selecting the optimal Rn (emission of reporter dye over starting background fluorescence) in the exponential portion of the amplification plot. To determine relative fold differences for each sample in each experiment, the Ct value for *MBF1* gene transcripts was normalized to the Ct value for *SIActin* or *Atβ-tubulin* and was calculated relative to a calibrator using the formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

2.4. “Single cell system” for transient co-transformation

Protoplasts used for transfection were isolated from BY2 tobacco cells. BY2 cells were cultured in a modified Murashige–Skoog medium (Duchefa, Roubaix, France). Other additives were as described by Nagata et al. [20], except the further inclusion of 100 mg L⁻¹ myo-inositol. Cell cultures (50 mL in 250 mL Erlenmeyer flasks) were kept in the dark at 25 °C under agitation (100 rpm). The cells (2 g) were digested in 20 mL solution containing 1.0% (w/v) cellulase 345 (Cayla, Toulouse, France), 0.2% (w/v) pectolyase Y-23 (Seishin Pharmaceutical, Tokyo, Japan), 0.6 M mannitol and 25 mM Tris MES [2-(4-morpholino)-ethane sulfonic acid] pH 5.5, at 37 °C for 1 h. Protoplasts were transfected by a modified polyethylene glycol method as described by Abel and Theologis [21]. Two constructs containing synthetic promoter fused to GFP coding sequence were used as expression reporter vector. The first one was an ethylene-inducible synthetic promoter named GCC promoter consisting of a 35S minimal promoter (–46) associated to four GCC-box repeats fused to GFP coding sequence [22]. The second one was the DR5 reporter construct consisting of a 35S minimal promoter (–46) associated to a synthetic auxin response element (DR5) made of nine tandem copies of the consensus AuxRE motif fused to GFP coding sequence [23]. The DR5-GFP construct was a gift of Klaus Palme, Institut für Biologie II-Botanik, Universität Friburg, Germany. Aliquots of 0.5×10^6 protoplasts were transformed with 10 µg of reporter construct in combination with 10 µg of a pGreen II-based effector construct. For each transformation three technical repeats were performed. After 17 h of incubation, GFP expression was analyzed by flow cytometry (FCM) that allows quantification of thousands of events to obtain rapidly significant values. FCM analyses were performed using FACS Calibur instrument (Becton-Dickinson, San Jose, CA) equipped with a 200-µm nozzle and a water-

cooled Enterprise coherent argon-ion laser (15 mW output) tuned to 488 nm. The sheet-fluid used was PBS buffer. GFP fluorescence was detected with an FITC 530/30-nm band-pass filter. For each sample, 100–1000 protoplasts were gated on forward light scatter, and the GFP fluorescence per population of cells corresponds to the average fluorescence intensity of the population of cells above the background threshold (set arbitrarily based on a zero DNA transformed control, so that all control cells fall below this threshold). Data were analyzed using CellQuest software (Becton-Dickinson). Each data point is the mean value of three biological experiment repeats.

2.5. Plant transformation

Tomato plants harbouring the 35S::*SIER24SRDX* insert were generated by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation according to Jones et al. [24]. Transformed lines were selected on hygromycin (25 mg L⁻¹) and analyzed by PCR using cDNA as template to check transgene expression. The protocol for *in planta* transformation of *Arabidopsis* was as described by Clough and Bent [25] and used with modifications. *A. tumefaciens* strain C58 carrying 35S::*AtMBF1cSRDX* binary construct were grown to stationary phase in LB medium at 28 °C, 250 rpm. Cells were harvested by centrifugation for 20 min, at room temperature, at 5500 g and then re-suspended to final OD₆₀₀ of two in inoculation medium containing 5% (w/v) sucrose and 0.05% (v/v) silwet L-77 (OSI Specialties, Inc., Danbury, CT, USA). Four-week-old plants were inverted into this suspension in order to submerge all floral buds and were then removed after 30 s of gentle agitation. Plants were left in a low-light location overnight and returned to the greenhouse the next day. Plants were grown for further 5–6 weeks until siliques were dry. The selection of putative transformants was done on a 25 mg L⁻¹ hygromycin-containing agar medium. Heterozygous lines, four of *Arabidopsis* (C2, C4, C12 and C17) and two of tomato (with two plants for each: 15-1 and 2; 82-1 and 2) have been retained for molecular and phenotypic analysis.

2.6. Germination assay

Seeds were collected from wild-type and heterozygous transgenic tomato fruit at the orange stage, treated with 0.05% HCl, washed abundantly with water and dried quickly on paper in ventilated area. In wild-type *Arabidopsis* and heterozygous transgenic plants grown together, seeds allowed to ripen for 2 months and then collected and stored at room temperature. *Arabidopsis* seeds were stratified at 4 °C for 5 days prior to being placed in germination condition at 23 °C. Tomato and *Arabidopsis* seeds were first surface-sterilized in 50% bleach solution for 10 min, rinsed seven to nine times in sterile distilled water and germinated on filter paper with gibberellic acid (GA₃) 150 µM or water as control solution.

2.7. Histochemical GUS analysis

The *SIER24* promoter sequence (GenBank accession number EU240881) was ligated in pLP100 binary expression

vector harboring GUS coding sequence as reporter gene. This construct was used to transform tomato MicroTom plant as described above. Seeds and seedling of transgenic lines bearing the *pSIER24::GUS* fusion construct, were incubated at 37 °C overnight with GUS staining solution (100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, 10 mM EDTA, 0.1% Triton, and 0.5 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid) to reveal GUS activity. Following GUS staining, samples were washed several times to extract chlorophyll using graded ethanol series and stored at 4 °C.

2.8. Confocal microscopy

The epidermal structures of *Arabidopsis* rosette leaves and inflorescence stem tissues were revealed using Congo red and observed by confocal microscopy [26]. *Arabidopsis* tissues from wild-type and *MBF1cSRDX* harvested from 5-week-old plants were first treated with ethanol step gradient (from 50% to 100% ethanol) for chlorophyll removal followed by a re-hydration step gradient (50% to 100% water). Samples were incubated in a 0.2% aqueous solution of Congo red (Merck, Darmstadt, Germany) overnight and rinsed in water. Congo red is a fluorescent dye that binds in a highly ordered fashion to cellulose fibrils. Confocal images of *MBF1cSRDX* and wild-type plant tissues were acquired with a confocal laser scanning system (Leica TCS SP2, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) using a 40 \times water immersion objective (numerical aperture 0.75). The samples were observed with the 543 nm ray line of a helium neon laser for excitation and emitted light were collected in the 560–800 nm spectral range. Cell length and surface were calculated using Image-pro Plus software (Media Cybernetics, MD). Up to 100 epidermal stem cells and leaf cells were used respectively for cell length and cell surface measurement.

3. Results

3.1. The EAR motif fused to ER24 is capable of repressing the activity of a GCC box-rich synthetic promoter in a “single cell system”

In order to evaluate the ability of the EAR domain to act as a repressor when fused to the transcriptional co-activator MBF1, we have first tested this chimeric construct using a transient expression driven by a synthetic promoter in a “single cell system” using protoplasts. The GCC box is a well known ethylene inducible *cis*-acting element that binds specifically transcription factors of the Ethylene Response Factor (ERF) family [22]. Tobacco BY2 protoplasts were co-transfected with the GCC-rich promoter fused to GFP as reporter construct and 35S::SRDX, or 35S::SIER24 or 35S::SIER24SRDX as effector constructs or an empty vector as control. Fig. 1A shows that, on the basis of 100% fluorescence for the empty vector, over-expression of EAR motif alone had no effect on expression of the GFP reporter gene, while over-expression of SIER24 alone stimulated expression to 140%. This result shows that SIER24 is able to act as a transcriptional activator on a GCC-containing

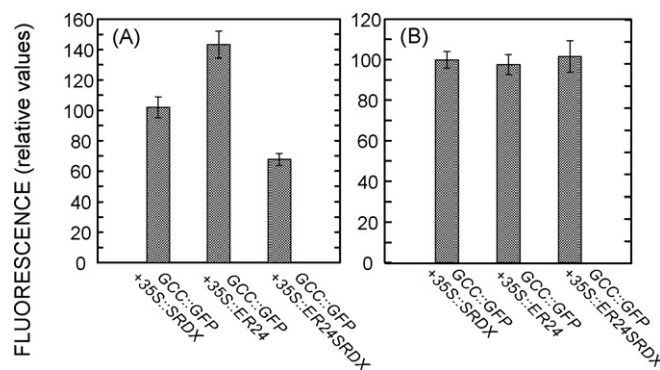


Fig. 1. Effect of *SIER24* or *SIER24SRDX* transient expression on GCC-rich synthetic promoter activity (A) and DR5 auxin-responsive synthetic promoter (B) evaluated in a “single cell system”. Tobacco BY2 protoplast were co-transfected with one of the three effectors constructs (35S::SRDX, 35S::SIER24 or 35S::SIER24SRDX) and an ethylene inducible synthetic GCC-rich promoter or a DR5 auxin-responsive promoter associated to the GFP reporter gene. Promoter activity was determined by quantification of fluorescence intensities by flow cytometry. Relative values on the Y-axis are expressed as percent of fluorescence obtained after co-transfection with the *GCC::GFP* or *DR5::GFP* constructs and an empty vector as effector. Values represent the mean \pm S.E. of three independent biological measurements.

promoter. The presence of the EAR motif in the ER24 construct caused a 2-fold repression of the GFP reporter gene as compared to ER24 alone or 32% repression compared to an empty vector. A reporter construct consisting of an auxin-inducible synthetic promoter (DR5) fused to GFP was also used to evaluate the specificity of SIER24SRDX repression activity. Over-expression of SIER24 alone or fused to EAR motif did not affected DR5 promoter activity (Fig. 1B). This result shows that EAR motif associated to a *MBF1* gene is able to repress transcription specifically on ethylene-responsive reporter gene *in vivo*.

3.2. Expression of the transgene and members of the MBF1 family

Four independent transgenic lines of *Arabidopsis* and tomato plants were generated via *Agrobacterium* transformation. All of them express the SRDX-chimeric transgene at a high level (Fig. 2A and B) without affecting the expression of both endogenous *SIER24* in tomato and *MBF1c* in *Arabidopsis* that were targeted for EAR repression as well as of other members of the *MB1* gene family (Fig. 2C and D).

3.3. The presence of an EAR repressor motif in a MBF transgene affects the germination process

In considering that *SIER24* was an ethylene-responsive gene and that ethylene is known to stimulate germination, we sought to assess the effect of expressing *SIER24* and *AtMBF1c* fused to the EAR motif on seed germination in *Arabidopsis* and tomato. Fig. 3 shows substantial differences in germination between wild-type and two independent transformed lines. But global observation of transgenic seeds morphology, *i.e.*: size, shape and testa color, did not show any difference compare

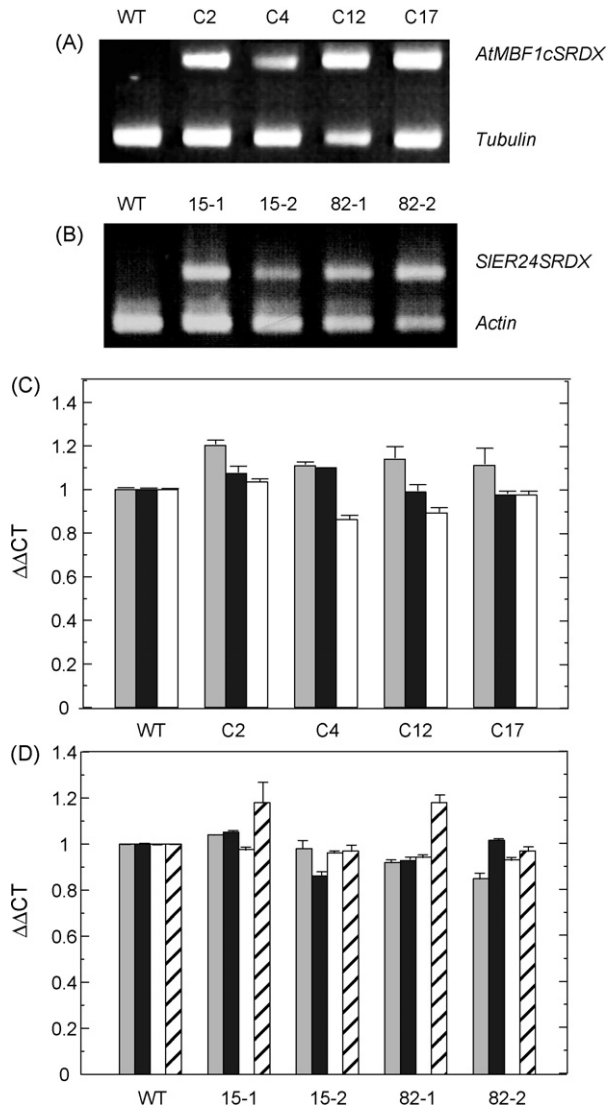


Fig. 2. Expression of the *SRDX* transgenes and genes of the *MBF1* family in four transgenic lines and wild-type of *Arabidopsis* and tomato. Expression of *AtMBF1cSRDX* in *Arabidopsis* (A) and *SIER24SRDX* in tomato (B) by semi-quantitative RT-PCR. Expression levels of *Arabidopsis MBF1a* (grey bar), *MBF1b* (black bar) and *MBF1c* (open bar) (C) and tomato *MBF1a* (grey bar), *MBF1b* (black bar), *MBF1c* (open bar) and *SIER24* (dashed bar), (D) transcripts assessed by real-time quantitative PCR. In C and D, $\Delta\Delta C_t$ refers to the fold difference in each transcript level relative to the wild-type taken as a reference sample and the data represent the mean values \pm S.E. of two independent replicates. C2, C4, C12 and C17 correspond to *AtMBF1cSRDX* transgenic lines of *Arabidopsis*. 15-1, 15-2, 82-1 and 82-2 correspond to *SIER24SRDX* transgenic lines of tomato.

to wild-type. In *Arabidopsis*, the presence of the *AtMBF1c* gene fused to the repressor caused considerable reduction of germination (Fig. 3A) with only 30% and 45% of the seeds capable to germinate after 120 h for the two transgenic lines as compared to almost 90% for wild-type seeds at 72 h. The presence of GA_3 increased the rate of germination and the final number of seeds capable to germinate rose to over 40% and 65% after 120 h for the two transgenic lines and over 95% for wild-type seeds (Fig. 3A). In tomato, unlike *Arabidopsis*, almost 100% of the seeds expressing *SIER24* fused to the repressor were able to germinate, but the rate of germination

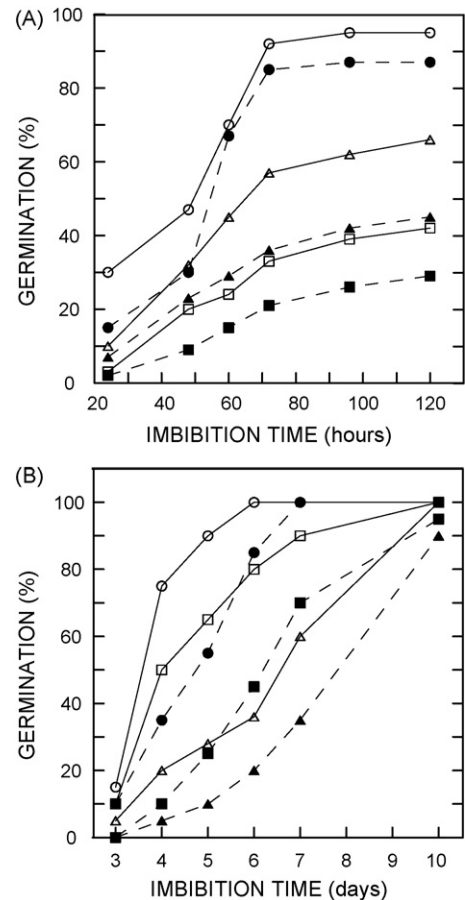


Fig. 3. Time course of germination of wild-type and two transgenic lines of *Arabidopsis*, C2 and C4 (A) and MicroTomato seeds, 15-1 and 82-1 (B). Seeds of two independent heterozygous transgenic lines (triangle and square symbols) and of wild-type (round symbols) were incubated at 22 °C in absence (dark symbols) or in presence (empty symbols) of 150 μ M GA_3 . The number of seeds showing visible radicle protrusion was counted (over 100 per experiment). Values correspond to the mean of two independent biological measurements.

was considerably lowered as compared to wild-type (Fig. 3B). The presence of GA_3 increased the rate of germination for all seeds (Fig. 3B).

3.4. *ER24* promoter expression pattern is consistent with a role of *ER24* in the germination process

The expression pattern conferred to GUS by the *SIER24* promoter was performed by histochemical analysis of *pER24::GUS* tomato seeds during germination and radicle elongation (Fig. 4). GUS activity could not be detected before 72 h after soaking (Fig. 4A and B). Activity was first detected in the radicle and the micropylar endosperm, just before the radicle protrusion (Fig. 4C). Thereafter, GUS activity was high during the first steps of elongation of the radicle (Fig. 4D–F). At later stages, GUS activity was persisting in the tip of the root and was high in the hypocotyl, particularly at the neck between root and hypocotyl and at the base of cotyledons (Fig. 4G and H). In separate experiments carried out with 2-week-old plants, GUS activity became undetectable even in the root tip.

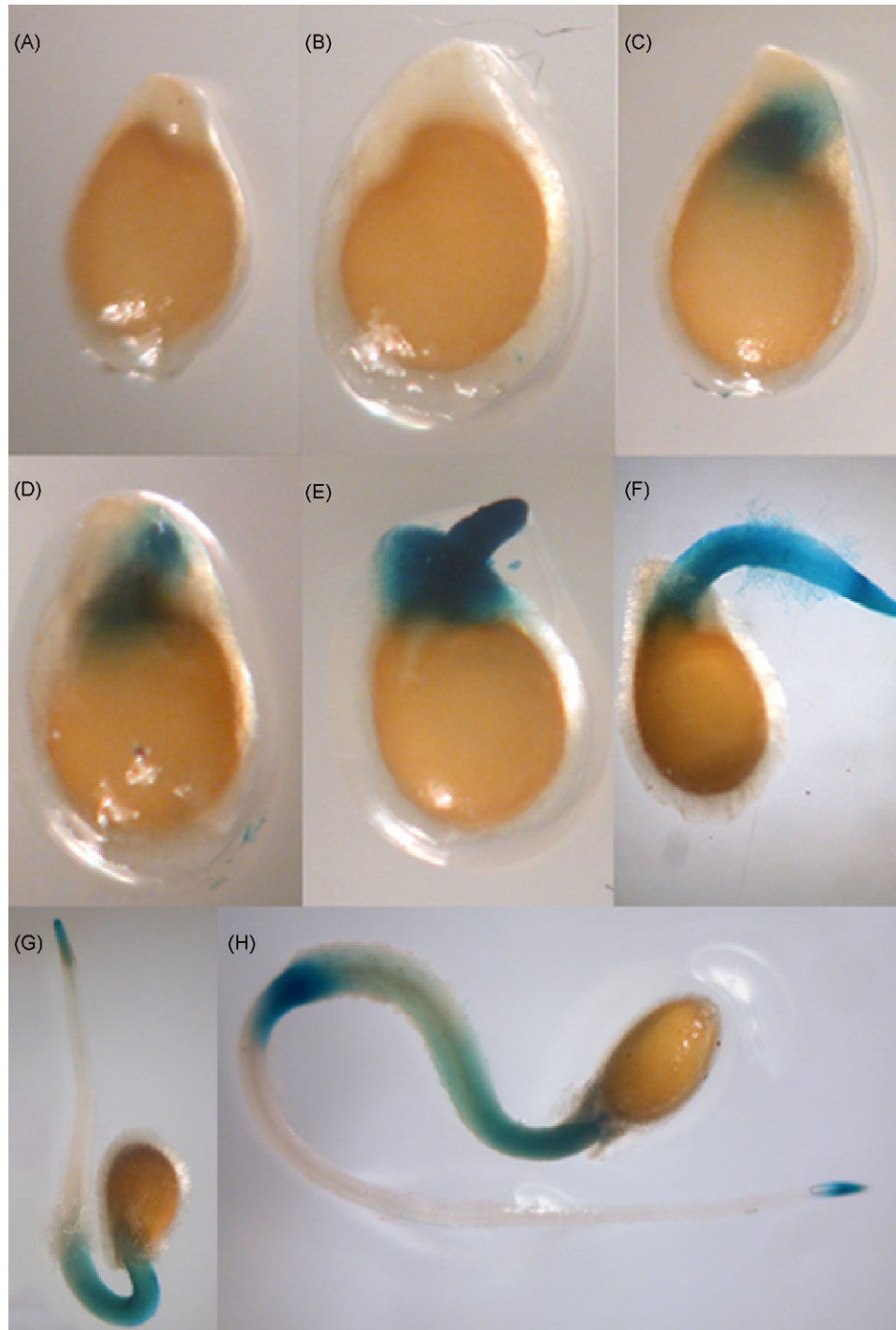


Fig. 4. Detection of GUS activity in transgenic *pSIR24::GUS* tomato seeds during germination and early developmental stages. Histochemical staining was monitored during the germination process at 24 h (A), 48 h (B) and 72 h (C) after imbibition, at radicle protrusion (D–F) and during seedling development (G–H).

3.5. The presence of an *SRDX* repressor motif in the *Arabidopsis MBF1c* transgene results in plant dwarfism

Four heterozygous independent lines of *Arabidopsis* plants harboring the *AtMBF1cSRDX* transgene have been generated. They clearly exhibit different levels of dwarfism (Fig. 5). Observations of the elongation of the first flower stalk indicated that the time of bolting remained unaffected but the stem elongated more slowly, resulting in at least a 2-fold reduction in

height (Fig. 5A) compared to the wild-type. Severe reductions in the length of petioles and leaf blades (Fig. 5B) and decrease in length and seed number (Fig. 5C–E) were also obvious in *AtMBF1cSRDX* plants (Fig. 5C). Alterations of plant development were associated with morphological modifications at the cell surface of stem and leaves (Fig. 6). Concerning the stems, the *AtMBF1cSRDX* plants exhibited strong reduction of cell length with a number of cells per stem width that was reduced to eighth as compared to 12 in the wild-type (Fig. 6A

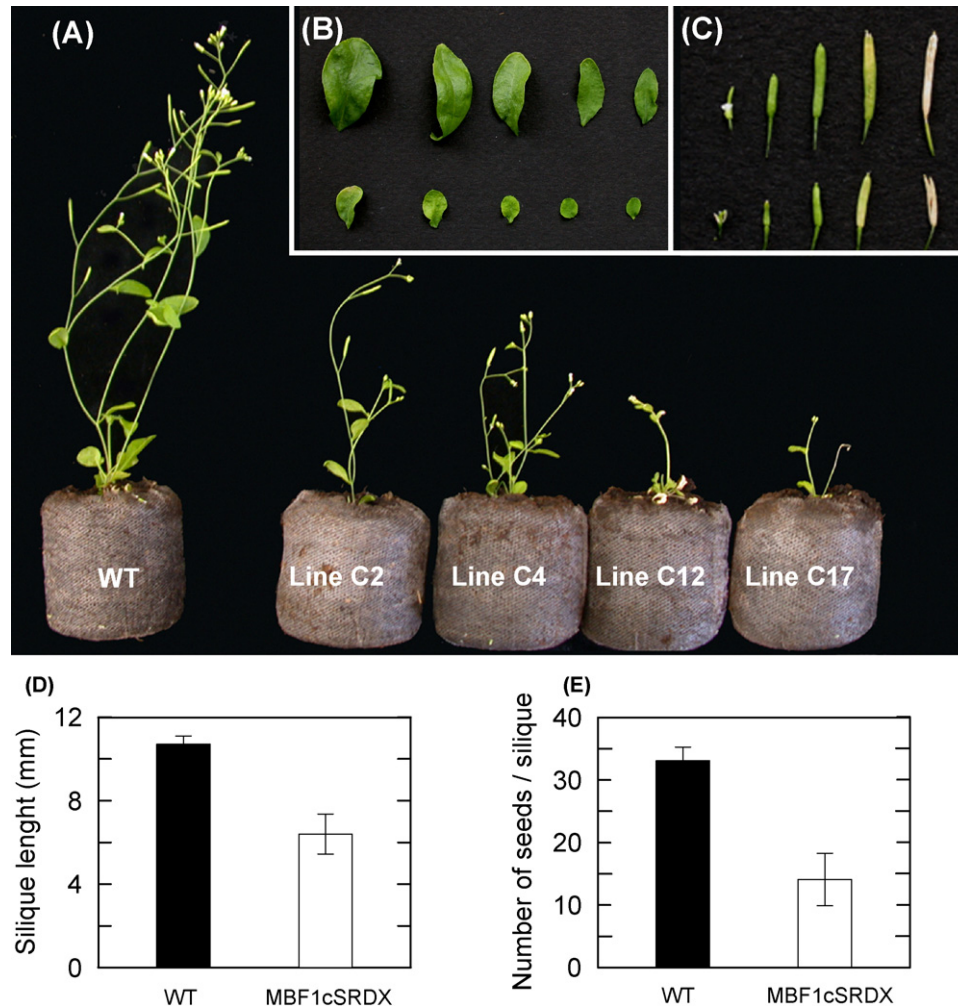


Fig. 5. Phenotypic comparison between *AtMBF1cSRDX* heterozygous transgenic lines and the wild-type grown under long-day conditions. (A) Five-week-old plants of wild-type (WT) and four *AtMBF1cSRDX* independent heterozygous lines (C2, C4, C12 and C17). (B) Inflorescence leaves from 8-week-old WT (top) and *AtMBF1cSRDX* (bottom) plants (C2). (C) Siliques from 8-week-old WT (top) and *AtMBF1cSRDX* (bottom) plants (C2). (D) Silique lengths and (E) number of seeds per silique of 8-week-old WT (dark bar) and *AtMBF1cSRDX* (empty bar) plants (C2). Each value represents the mean \pm S.E. for around 30 siliques.

and B) and a shift of the distribution of the cell length classes towards the smaller size range (Fig. 6E). The leaves of plants harbouring the *AtMBF1cSRDX* transgene showed a significant reduction of the cell area with a higher number of cells per leaf (Fig. 6C and D). Accordingly, the cell surface of the *AtMBF1cSRDX* plants is predominately spread over the small classes (Fig. 6F). Surprisingly, the two MicroTom tomato lines in which *S/ER24* was repressed and for which germination was affected, did not exhibit significant alteration of plant growth and no visible alteration of the timing of color changes during fruit ripening (data not shown).

4. Discussion

The use of an EAR-motif chimeric repressor, denominated CRES-T system [15], has been successful for analyzing the functions of transcription factors in cases where single gene knock out or antisense lines failed to display any obvious abnormal phenotypes. The major advantage of this system is to overcome functional redundancy of transcription factors

belonging to multigene families [16,17]. Nevertheless, this strategy has not been used yet for transcriptional co-activators. Since no visible phenotype could be observed by using VIGS or antisense strategy, we decided to use the CRES-T system for disturbing the function of members of the MBF1 co-activators gene family. Single cell system consisting of transient protoplast transformation is a rapid and reliable method to evaluate the capability of different types of effectors to regulate the transcriptional activity of a target promoter fused to a reporter gene [27]. Since ER24 was identified as an ethylene-responsive gene [8], a synthetic promoter containing four GCC boxes was used in the present work for evaluating the repressor activity of *S/ER24SRDX*. Data from Fig. 1 show that when *S/ER24* was fused to the EAR motif, the expression of the GCC containing promoter was significantly reduced. This suggests that, within the MBF1 transcriptional complex, ERFs are engaged in the binding to GCC boxes. This hypothesis is supported by the recent observation that ERFs were capable to interact with MBF1 co-activators in tobacco [28]. The ER24-EAR fusion protein is unable to recognise DR5, an auxin-

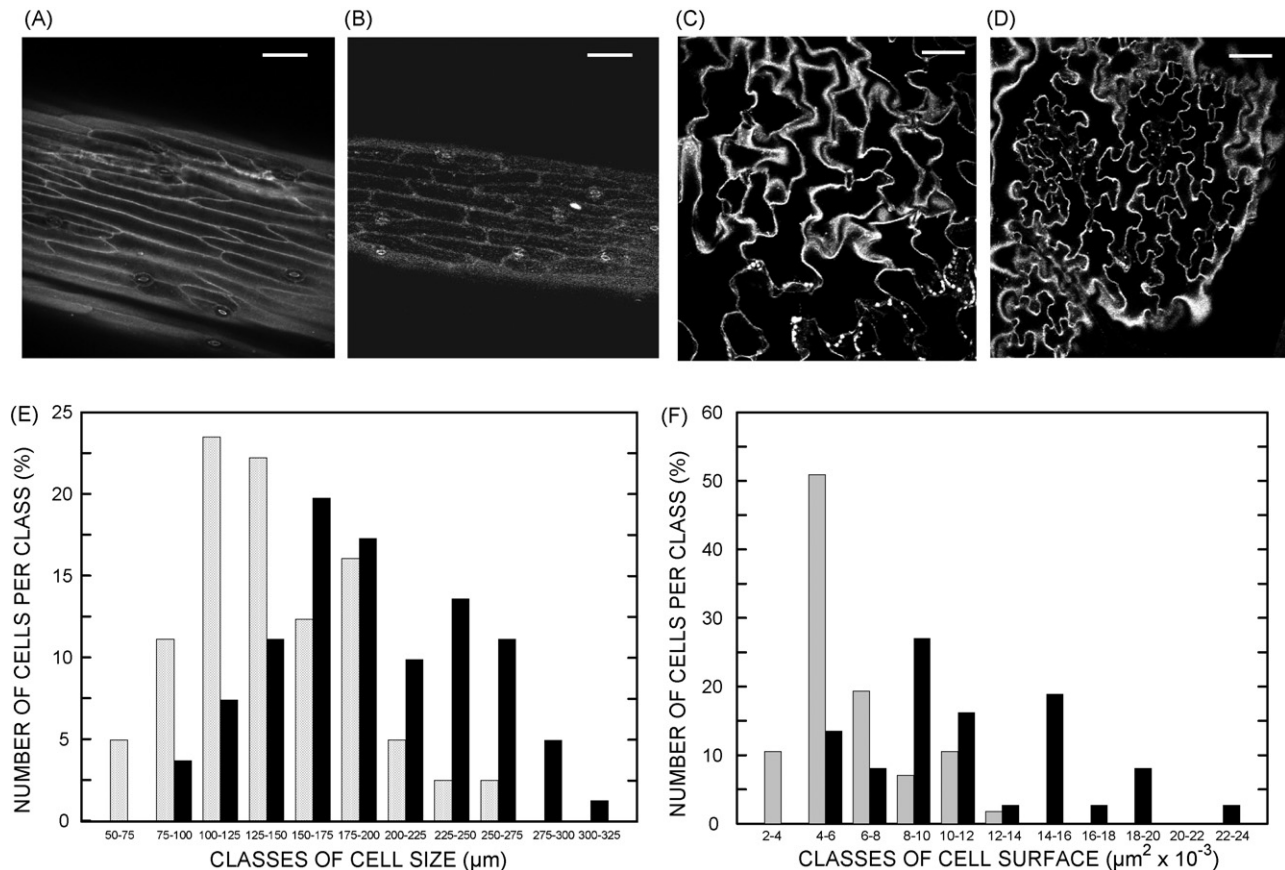


Fig. 6. Confocal microscopy analysis of 8-week-old *Arabidopsis* stem and leaves after Congo red staining. View of WT (A) and *AtMBF1cSRDX* (B) stem epidermis surface. View of WT (C) and *AtMBF1cSRDX* (D) leaf epidermis surface. Horizontal white bars of A, B, C and D correspond to 50 μm. Distribution of cell size of stems (E) and cell surface of leaves (F) in a population of 100 stem or leaf cells of WT (dark bars) or *AtMBF1cSRDX* (grey bars).

responsive synthetic promoter, again supporting the specificity of ER24 binding to the GCC box. Taken together, these data are ruling out a non-specific effect of the fusion protein. Our data also show that over-expression of *SIER24* alone stimulated transcriptional activity of the reporter gene as compared to empty vector, indicating that the *SIER24* protein was present at limiting levels in the protoplasts.

Having demonstrated the capability of the EAR motif to inhibit the activity of MBF1 co-activators, we sought to evaluate the effects of the EAR motif on the development of whole plants of *Arabidopsis* and tomato after stable transformation. Our experiments demonstrate that both *Arabidopsis* and tomato transgenic lines show developmental alterations. One of the most obvious phenotype was related to a reduction of the number of seeds capable to germinate in *Arabidopsis* and to an important delay in the germination rate in tomato (Fig. 3). The role of *SIER24* in the germination process is further substantiated by the pattern of GUS activity driven by *SIER24* promoter that shows strong expression at the early stages of root emergence.

Seed germination is a complex physiological process promoted by water imbibition after the eventual release of dormancy mechanism by appropriate triggers. Seed germination is controlled by the antagonistic action of gibberellic acid (GA) and abscissic acid (ABA) [29]. However, ethylene is also

known for playing a role in seed germination where it counteracts ABA effects [30] and induces endosperm weakening by regulating the activity of cell wall-modifying proteins such as endo-β-mannanase [31] and β-Glucanase I [32]. Indeed, the ethylene insensitive *Arabidopsis* mutant *ein2* and *etr1* have enhanced dormancy [33] and ethylene is able to fully rescue the germination defect of the GA mutant of *Arabidopsis* *ga-1* [34]. The capability of GA treatments to overcome the effect of the *SRDX-SIER24* or *SRDX-AtMBF1c* transgene over-expression suggests the possible involvement of *SIER24* and *AtMBF1c* in the ethylene transduction pathway. This hypothesis is further supported by the fact that up-regulation of the ethylene response factor *SIERF2*, which interacts with MBF1, stimulates seed germination through the induction of the *mannanase2* gene [35]. Altogether these data suggest that MBF1 could be a component of the ethylene signal transduction pathways by regulating gene expression in seeds and thus mediating germination. However, MBF1 is probably not participating in all aspects of ethylene action. Over-expression of *SRDX-SIER24* or *SRDX-AtMBF1c* had no effect on ethylene triple response of etiolated seedlings. In addition, MBF1 may also be involved in the response to other hormones that are known to participate in GA/ABA cross-talk for the control of dormancy release and germination [36]. Elements putatively involved in the response to several hormones

(ethylene, GA, salicylic acid and methyl jasmonate) are present in the promoter sequence of *SIER24* (data not shown).

In *Arabidopsis*, contrary to tomato, *SRDX* repression of MBF1c gene caused a decrease in the percentage of seeds capable to germinate and GA could not fully restore the germination capacities to the level of the wild-type. Such a difference could be related to the growth reduction of *Arabidopsis* plants that could affect the viability of a certain percentage of seeds, while in tomato plant growth was not affected.

The EAR driven dominant repression causes a reduction in size of *Arabidopsis* plants by affecting cell size and cell number. Cell size reduction is particularly apparent in leaf epidermis where most of the cells have significant cell surface reduction comparatively to the wild-type. Cell division and elongation are under the control of hormones. Because ethylene is acting as a growth inhibitor in dicotyledonous plants, it is difficult to assess a role for MBF1 co-activators in ethylene action. If such was the case, MBF1-repressed plants would exhibit growth stimulation. More probably, repression of MBF1 prevents some of the hormones involved in cell division and elongation from being active. Candidate hormones are numerous (gibberellins, cytokinins, auxins, brassinosteroids) and it is difficult to suspect those whose action would be affected. However, we have observed very little or no effect of EAR repression of *SIER24* on the growth of the MicroTom genotype tomatoes. This genotype is affected in the synthesis of brassinosteroids which could explain the dwarfism of the plant [37]. These elements put together would suggest that EAR repression of MBF1 has no significant effect on MicroTom plant growth due to the absence of brassinosteroid biosynthesis, contrary to *Arabidopsis*. In this respect, it would be useful to perform transformation of regular genotypes of tomato. More experiments are anyway necessary to determine whether EAR repression of MBF1 function results in an alteration of the synthesis brassinosteroids or other hormones. As already mentioned above, analysis of the promoter sequence of *SIER24* revealed the presence of predicted *cis*-elements putatively involved in the response to ethylene, gibberellins, salicylic acid and methyl jasmonate.

The expression of the transgene in all four independent transgenic lines of *Arabidopsis* and tomato did not affect the expression of the corresponding endogenous gene and other members of the MBF1 family, indicating that the phenotypes observed are directly linked to the inhibition of the functionality of *SIER24* or *AtMBF1c* by the EAR motif. However, although our experiments have been targeted to repress the function of *SIER24* in tomato and *AtMBF1c* in *Arabidopsis*, it may happen that other members of the MBF1 family be functionally affected maybe through competitive occupation of their transcription activation site as hypothesized by Takase et al. [17].

Nevertheless, our data show that the dominant repressor domain EAR can be used successfully with transcriptional co-activators that do not interact directly with DNA such as MBF1 in *Arabidopsis* and tomato in the presence of the corresponding endogenous factors and of functionally redundant transcriptional co-activators.

Acknowledgements

The authors are grateful to Simone Albert, Carole Malitte, Hélène Mondies and Dominique Saint-Martin for transformation and culture of *Arabidopsis* and tomato plants and Sophie Poles for her participation in the real-time PCR experiments. This work was supported by the Midi-Pyrénées Regional Council (grants 06003789 and 07003760) and forms part of the requirements for the PhD degree for M.H.

References

- [1] R.G. Roeder, The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly, *Trends Biochem. Sci.* 16 (1991) 402–408.
- [2] F.Q. Li, H. Ueda, S. Hirose, Mediators of activation of fushi tarazu gene transcription by BmFTZ-F1, *Mol. Cell Biol.* 14 (1994) 3013–3021.
- [3] K. Takemaru, F.Q. Li, H. Ueda, S. Hirose, Multiprotein bridging factor 1 (MBF1) is an evolutionarily conserved transcriptional co-activator that connects a regulatory factor and TATA element-binding protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (1997) 7251–7256.
- [4] K. Takemaru, S. Harashima, H. Ueda, S. Hirose, Yeast co-activator MBF1 mediates GCN4-dependent transcriptional activation, *Mol. Cell Biol.* 18 (1998) 4971–4976.
- [5] A.M. Naar, B.D. Lemon, R. Tjian, Transcriptional co-activator complexes, *Annu. Rev. Biochem.* 70 (2001) 475–501.
- [6] Q.X. Liu, M. Jindra, H. Ueda, Y. Hiromi, S. Hirose, Drosophila MBF1 is a co-activator for Trachea Defective and contributes to the formation of tracheal and nervous systems, *Development* 130 (2003) 719–728.
- [7] M. Jindra, I. Gaziova, M. Uhlirova, M. Okabe, Y. Hiromi, S. Hirose, Coactivator MBF1 preserves the redox-dependent AP-1 activity during oxidative stress in Drosophila, *EMBO J.* 23 (2004) 3538–3547.
- [8] H. Zegzouti, B. Jones, P. Frasse, C. Marty, B. Maitre, A. Latché, J.C. Pech, M. Bouzayen, Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display, *Plant J.* 18 (1999) 589–600.
- [9] K. Tsuda, T. Tsuji, S. Hirose, K. Yamazaki, Three *Arabidopsis* MBF1 homologs with distinct expression profiles play roles as transcriptional co-activators, *Plant Cell Physiol.* 45 (2004) 225–231.
- [10] A.V. Godoy, M.E. Zanetti, B. San Segundo, C.A. Casalongue, Identification of a putative *Solanum tuberosum* transcriptional co-activator up-regulated in potato tubers by *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* infection and wounding, *Physiol. Plant* 112 (2001) 217–222.
- [11] N. Suzuki, L. Rizhsky, H. Liang, J. Shuman, V. Shulaev, R. Mittler, Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional co-activator multiprotein bridging factor 1c, *Plant Physiol.* 139 (2005) 1313–1322.
- [12] K. Tsuda, K. Yamazaki, Structure and expression analysis of three subtypes of *Arabidopsis* MBF1 genes, *Biochim. Biophys. Acta* 1680 (2004) 1–10.
- [13] D.P. Arce, C. Tonon, M.E. Zanetti, A.V. Godoy, S. Hirose, C.A. Casalongue, The potato transcriptional co-activator StMBF1 is up-regulated in response to oxidative stress and interacts with the TATA-box binding protein, *J. Biochem. Mol. Biol.* 39 (4) (2006) 355–360.
- [14] M.J. Kim, G.H. Lim, E.S. Kim, C.B. Ko, K.Y. Yang, J.A. Jeong, M.C. Lee, C.S. Kim, Abiotic and biotic stress tolerance in *Arabidopsis* overexpressing the multiprotein bridging factor 1a (MBF1a) transcriptional coactivator gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354 (2) (2007) 440–446.
- [15] K. Hiratsu, K. Matsui, T. Koyama, M. Ohme-Takagi, Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis*, *Plant J.* 34 (5) (2003) 733–739.
- [16] K. Matsui, K. Hiratsu, T. Koyama, H. Tanaka, M. Ohme-Takagi, A chimeric AtMYB23 repressor induces hairy roots, elongation of leaves and stems, and inhibition of the deposition of mucilage on seed coats in *Arabidopsis*, *Plant Cell Physiol.* 46 (1) (2005) 147–155.
- [17] T. Takase, M. Yasuhara, S. Geekiyanage, Y. Ogura, T. Kiyosue, Overexpression of the chimeric gene of the floral regulator CONSTANS and the

- EAR motif repressor causes late flowering in *Arabidopsis*, *Plant Cell Rep.* 26 (6) (2007) 815–821.
- [18] N. Mitsuda, K. Hiratsu, D. Todaka, K. Nakashima, K. Yamaguchi-Shinozaki, M. Ohme-Takagi, Efficient production of male and female sterile plants by expression of a chimeric repressor in *Arabidopsis* and rice, *Plant Biotechnol.* 4 (2006) 325–332.
- [19] R.P. Hellens, E.A. Edwards, N.R. Leyland, S. Bean, P.M. Mullineaux, pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation, *Plant Mol. Biol.* 42 (6) (2000) 819–832.
- [20] T. Nagata, Y. Nemoto, S. Hasezawa, Tobacco BY-2 cell line as the HeLa cell in the cell biology of higher plants, *Int. Rev. Cytol.* 132 (1992) 1–30.
- [21] S. Abel, A. Theologis, Transient transformation of *Arabidopsis* leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression, *Plant J.* 5 (1994) 421–427.
- [22] M. Ohme-Takagi, H. Shinshi, Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element, *Plant Cell* 7 (1995) 173–182.
- [23] I. Ottenschlager, P. Wolff, C. Wolverton, R.P. Bhalerao, G. Sandberg, H. Ishikawa, M. Evans, K. Palme, Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 2987–2991.
- [24] B. Jones, P. Frasse, E. Olmos, H. Zegzouti, Z.G. Li, A. Latché, J.C. Pech, M. Bouzayen, Down-regulation of DR12, an auxin-response-factor homolog, in the tomato results in a pleiotropic phenotype including dark green and blotchy ripening fruit, *Plant J.* 32 (4) (2002) 603–613.
- [25] S.J. Clough, A.F. Bent, Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 16 (6) (1998) 735–743.
- [26] J.P. Verbelen, S. Kerstens, Polarization confocal microscopy and congo red fluorescence: a simple and rapid method to determine the mean cellulose fibril orientation in plants, *J. Microsc.* 198 (Pt 2) (2000) 101–107.
- [27] S.B. Tiwari, G. Hagen, T. Guilfoyle, The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription, *Plant Cell* 15 (2) (2003) 533–543.
- [28] K. Yamakashi, S. Hirose, Ethylene-responsive transcription coactivators in plants, US patent n° 7 238 857 July 3 (2007).
- [29] J.D. Bewley, Seed germination and dormancy, *Plant Cell* 9 (1997) 1055–1066.
- [30] N. Beaudoin, C. Serizet, F. Gosti, J. Giraudat, Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades, *Plant Cell* 12 (7) (2000) 1103–1115.
- [31] P. Dahal, D.J. Nevins, K.J. Bradford, Relationship of Endo-[beta]-D-mannanase activity and cell wall hydrolysis in tomato endosperm to germination rates, *Plant Physiol.* 113 (4) (1997) 1243–1252.
- [32] G. Leubner-Metzger, L. Petruzzelli, R. Waldvogel, R. Vogeli-Lange, F. Meins, Ethylene-responsive element binding protein (EREBP) expression and the transcriptional regulation of class I beta-1,3-glucanase during tobacco seed germination, *Plant Mol. Biol.* 38 (5) (1998) 785–795.
- [33] M. Ghassemian, E. Nambara, S. Cutler, H. Kawaide, Y. Kamiya, P. McCourt, Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 12 (7) (2000) 1117–1126.
- [34] C.M. Karssen, S. Zagorski, J. Kepczynski, S.P.C. Groot, Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination, *Ann. Bot.* 63 (1989) 71–80.
- [35] J. Pirrello, F. Jaimes-Miranda, M.T. Sanchez-Ballesta, B. Tournier, Q. Khalil-Ahmad, F. Regad, A. Latche, J.C. Pech, M. Bouzayen, Sl-ERF2, a tomato ethylene response factor involved in ethylene response and seed germination, *Plant Cell Physiol.* 47 (9) (2006) 1195–1205.
- [36] B. Kucera, M.A. Cohn, G. Leubner-Metzger, Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination, *Seed Sci. Res.* 15 (2005) 281–307.
- [37] L.L. Haubrick, S.M. Assmann, Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles, *Plant Cell Environ.* 29 (3) (2006) 446–457.

4- Résultats complémentaires

4-1 localisation subcellulaire de SIER24 par transformation transitoire

Des travaux concernant la localisation subcellulaire des MBF1 d'*Arabidopsis* utilisant la technique transitoire de biolistique par bombardement d'épiderme d'oignon, montrent une localisation préférentielle de ces facteurs dans le compartiment nucléaire et plus particulièrement dans le sous-compartiment nucléolaire (Sugikawa *et al.*, 2005). Dans cette même optique, la localisation de la protéine SIER24 fusionnée à la GFP a été entreprise dans un système cellulaire transitoire: la transformation de protoplastes de tabac.

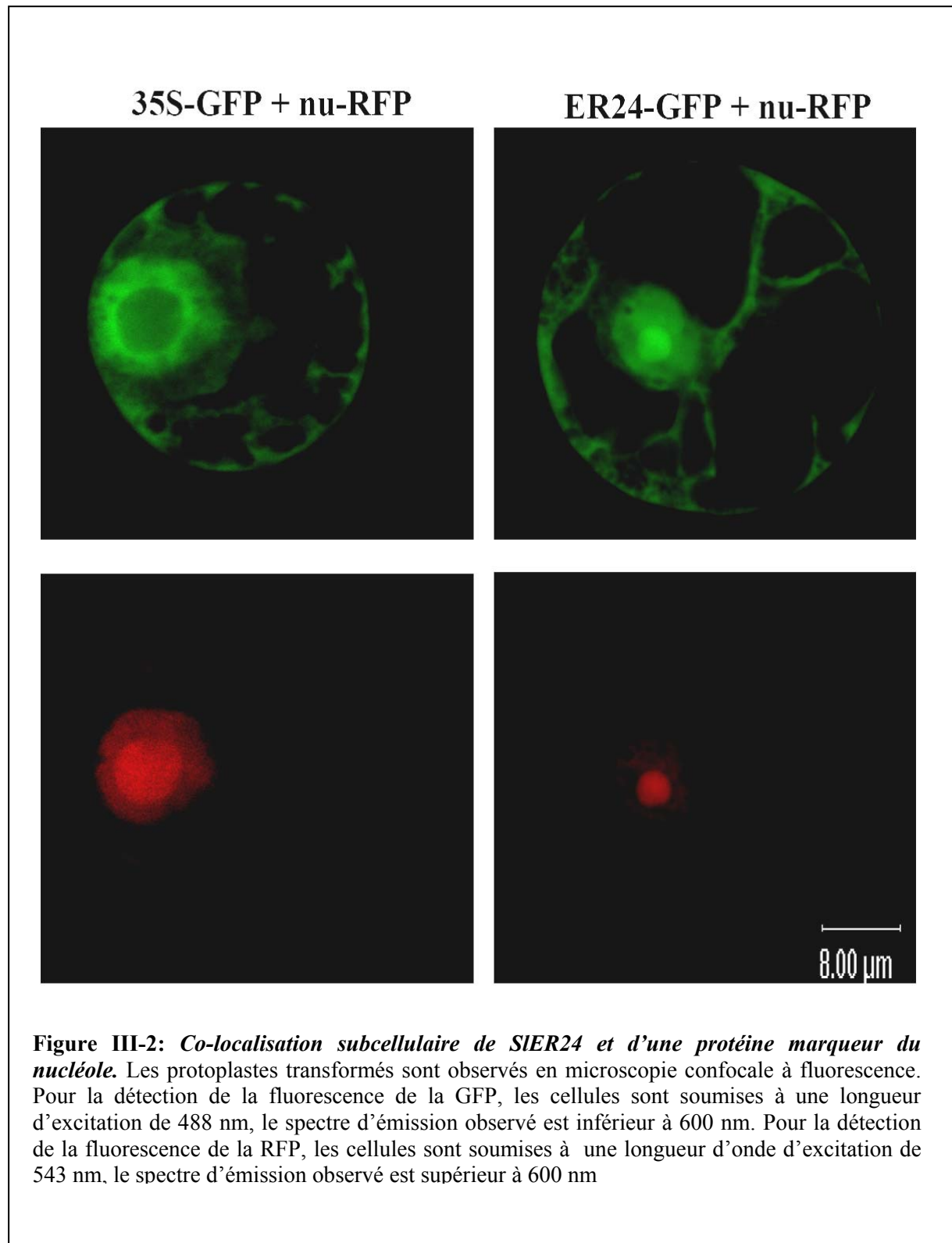
4-1-1 Matériel et méthode

Les protoplastes utilisés pour la transformation ont été obtenus à partir de suspensions cellulaires de tabac BY2 selon le protocole décrit dans Bouzayen *et al.* (1989). Les protoplastes sont transformés par traitement chimique au PEG (polyéthylène glycol) selon une méthode décrite par Abel et Theologis (1994). 0.2 ml de suspension de protoplastes (environ 5.10^5 cellules) ont été transformés en présence de 50 µg d'ADN de sperme de saumon avec 10 µg de chaque plasmide. Les cotransfections sont réalisées avec le construit 35S::ER24::GFP ou 35S::GFP (témoin) et un gène codant une protéine dirigée vers le nucléole fusionné à la RFP (*Red Fluorescent Protein*) (Pih *et al.*, 2000). Les protoplastes transformés sont observés en microscopie confocale (Leica TCS SP2, Leica DM IRBE; Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) équipé d'un microscope inversé (Leica) et un objectif à immersion eau 40X (ouverture numérique 0.75). Pour la GFP, les échantillons sont observés à la longueur d'onde d'excitation de 488 nm d'un laser néon hélium et la lumière émise collectée entre 500–580 nm. Pour la RFP, la fluorescence est observée à la longueur d'onde d'excitation de 543 nm et la lumière émise collectée dans le spectre 600-660 nm.

4-1-2 Résultat et conclusion

Pour les expériences de localisation subcellulaire, une construction témoin comportant le gène codant la RFP (*Red Fluorescent Protein*) associé au gène codant la fibrillarine d'*Arabidopsis* (GenBank : At5g52470) localisée dans le noyau et plus particulièrement dans le nucléole, a été utilisée. Après transformation, la GFP seule est présente dans tous les

compartiments cellulaires à l'exception de la vacuole et du nucléole (figure III-2). En revanche, la fusion de la GFP à ER24 conduit à une localisation préférentielle dans le noyau par rapport au cytoplasme. La concentration de la protéine de fusion est la plus forte dans le nucléole. Cependant, sa localisation subcellulaire n'est pas modifiée par des traitements à l'éthylène ou son inhibiteur le 1-MCP et n'est pas modifiée non plus en réponse à un stress chaleur. La présence de la protéine ER24 dans le noyau peut être corrélée avec son rôle de co-activateur dans les complexes de transcription. De plus, son abondance dans le nucléole est corroborée avec la localisation des MBF1 d'*Arabidopsis* (Sugikawa *et al.*, 2005). Le nucléole est un compartiment cellulaire peu connu qui correspond à des régions compactées de l'ADN, il est le siège de la transcription de certains ARN ribosomiques et de l'assemblage des ribosomes. De plus, des études récentes montrent son implication dans la réponse au stress chez les animaux (Mayer et Grummt, 2005), en particulier à travers des phénomènes de séquestration de protéines. La GFP seule est peu présente dans le nucléole ce qui suggère la nécessité d'un mécanisme ciblé de transport et/ou de séquestration permettant la localisation nucléolaire de la protéine. En effets, chez les animaux, des travaux décrivent l'existence de phénomènes de translocation vers le cytoplasme, de protéines impliquées dans les réponses aux stress, stockées dans ce compartiment sub-nucléaire. Le nucléole se présente donc comme une structure dynamique capable de séquestrer ou de relarguer des protéines en fonction des besoins de la cellule. Il intervient notamment, pour orchestrer une chaîne d'évènements utilisés par la cellule pour répondre de façon adaptée à un stress (Mayer et Grummt, 2005).



4-2 tentative de diminution de l'expression de *SIER24* par une approche

VIGS

Pour l'étude fonctionnelle des gènes de la famille des MBF1, nous avons utilisé en complément des transformations stables, une méthodologie de « silencing » faisant appel à vecteur viral qui est appelée « *Virus-Induced Gene Silencing* » (VIGS). Le principe de cette méthode consiste à détourner et utiliser un système d'infection viral pour provoquer une répression transitoire d'un ou plusieurs gènes. Lorsqu'un virus infecte un tissu de la plante, il se répand de façon systémique dans tout les tissus et les transcrits viraux sont dégradés par un processus d'inhibition post-transcriptionnelle appelé « *Post-Transcriptional Gene Silencing* » ou PTGS (Baulcombe, 2004). Le PTGS est un mécanisme de défense naturel des plantes qui se traduit par la dégradation spécifique d'ARN (Waterhouse *et al.*, 2001). Ainsi la stratégie VIGS utilise des vecteurs viraux contenant une séquence d'un gène d'intérêt que l'on souhaite réprimer afin de provoquer un mécanisme de PTGS spécifiquement dirigé contre ce gène. La méthode VIGS a été largement utilisée pour l'étude fonctionnelle de gènes, initialement chez *Nicotiana benthamiana* (Ratcliff *et al.*, 2001), mais qui a été ensuite adaptée à d'autres espèces, en particulier le piment (Chung *et al.*, 2004), la pomme de terre (Brigneti *et al.*, 2004, Faivre-Rampant *et al.*, 2004), le pétunia (Chen *et al.*, 2004) et la tomate (Liu *et al.*, 2002, Fu *et al.*, 2005).

Par comparaison avec la transformation stable, l'utilisation du VIGS a l'avantage de raccourcir très sensiblement le temps entre le clonage du gène et l'observation du phénotype. Mais aussi, de mettre en évidence la fonction de gènes dont la mutation est létale dans le cas de la transformation stable. La méthodologie VIGS permet, de surcroît, de pouvoir affecter l'expression de gène d'intérêt dans un tissu spécifique à un stade de développement choisi sans faire appel à un promoteur spécifique. Cette méthodologie a été utilisée, préalablement aux transformations stables utilisant le domaine répresseur EAR, pour tenter d'inhiber les gènes de la famille des MBF1 chez la tomate.

4-2-1 Matériel et méthode

Construction des plasmides:

Les transformations sont réalisées en utilisant le système de vecteurs binaires (pTRV1/pTRV2) décrits dans Liu *et al.* (2002). Les fragments correspondants au gène à réprimer ont été clonés dans le vecteur pTRV2 par une méthode de clonage Gateway (Invitrogen). Les fragments sont amplifiés par PCR à partir d'ADNc de fruits de tomate en

utilisant la TAQ DNA polymérase (Promega) et un couple d'oligonucléotides spécifiques contenant des sites de clonage partiels pour le clonage de type Gateway attB1 (pour l'amorce sens) et attB2 (pour l'amorce reverse). Ces couples d'oligo-nucléotides sont les suivants :

ER24-3UTR-F: 5' AAAAAGCAGGCTTCTGAGAAGTATGATTTTAAATTTGTG 3'

ER24-3UTR-R : 5' CAAGAAAGCTGGGTGTCTCATGACTTGTGAATTTTACC 3'.

ER24-ATG-F: 5' AAAAAGCAGGCTTCAATCGTGCTGCAGAAGCCAAAGATG 3'

ER24-ATG-R : 5' CAAGAAAGCTGGGTGGTTCGATTTTCTTCACCGTTTGAAC 3'

ER24-COMPLET-F: 5' AAAAAGCAGGCTTCATGCCGATGCGACCAACAGGGG 3'

ER24-COMPLET-R 5' CAAGAAAGCTGGGTGTGACTTGTGAATTTTACCTCTAAG 3'

MBF1B-3UTR-F : 5' AAAAAGCAGGCTTCAGCTCTTGGTGCGAACTTCGTG 3'

MBF1B-3UTR-R : 5' CAAGAAAGCTGGGTGGAATCCAGACACAAGAACCACC 3'

MBF1-CONSENSUS-F: 5' AAAAAGCAGGCTTCGGAAAGGCAATTCCAAACCAACAA
ATAATCTCTAACTGG 3'

MBF1-CONSENSUS-R: 5' CAAGAAAGCTGGGTGCCAAGAGCTCTCTCCAGTTTAGA
GATTATTTGTTGGTTTG 3'

PDS-F : 5' AAAAAGCAGGCTTCCGGTCTAGAGGCACTCAACTTTATAAACC 3'

PDS-R 5' CAAGAAAGCTGGGTGCGGGGATCCCTTCAGTTTCTGTCAAACC 3'

Les fragments obtenus (ER24-3UTR, ER24-ATG, ER24-complet, MBF1B-3UTR, MBF1-consensus et PDS) sont amplifiés par PCR avec des amorces universelles attB1 et attB2. Les amplicons sont insérés dans le vecteur pTRV2 par la BP clonase (Invitrogen) conformément aux recommandations du fabricant. Après vérification des construits par séquençage, les plasmides pTRV2 obtenus après recombinaison ainsi que le vecteur pTRV1 sont utilisés pour transformer des agrobactéries par électroporation.

Agro-infection

Un volume de 1 mL de chaque culture d' *A. tumefaciens*, souche GV3101, contenant chacune un vecteur pTRV, a été cultivé pendant 8 à 10 h à 28°C dans un milieu Luria-Bertani (LB) contenant 50 µg.ml⁻¹ de kanamycine et 100 µg.ml⁻¹ de rifampicine. Les cultures contenant *A. tumefaciens* avec un vecteur dérivé du pTRV2 ont été transférées dans 20 mL de LB et celle contenant la souche pTRV1 ont été transférées dans 100mL de milieu LB frais sans antibiotiques et agitées pendant une nuit à 28°C. Les agrobactéries ont été ensuite sédimentées, lavées et re-suspendues dans un tampon d'infiltration (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, pH 5.6, 150 µM acétosyringone) pour obtenir une densité finale de 0,4 à une DO de 600

nm pour pTRV1 ou de 0.2 pour pTRV2. Les cultures ont été incubées, sous agitation à 50 rpm pendant 3 h à température ambiante avant infiltration. Avant de procéder à l'infiltration, du Silwet L-77 a été ajouté à la suspension à une concentration finale de 0.04%. Les plantules de tomate de la variété *MicroTom* et *Ailsa Craig* cultivées en pot, ont été infectées à l'émergence de la première paire de feuilles, habituellement 3 à 4 semaines après le semis. Deux méthodes d'infection ont été utilisées. Pour l'agro-infiltration, les plantes ont été totalement immergées individuellement dans la solution d'*Agrobacterium* en les retournant dans un b cher contenant le mélange des deux solutions d'agrobactéries. L'ensemble est ensuite placé dans un dessiccateur à vide, soumis à un vide de 500mm Hg pendant 2 min puis ramené rapidement à pression atmosphérique normale. Pour l'agro-injection, la solution d'agrobact rie est infiltrée avec une seringue de 1 mL dans la tige principale, avec un volume maximum injecté de 600 l.

4-2-2 Résultats et conclusion

Les plants de tomate ont été transformés avec différentes combinaisons de vecteur. Celles-ci permettent soit de cibler spécifiquement la répression sur un gène de la famille *MBF1*, soit d'altérer les quatre MBF1 en même temps. Ainsi les constructions ER24-ATG et ER24-3UTR, permettant de cibler spécifiquement *ER24*, possèdent les séquences du gène les plus divergentes par rapport aux autres MBF1. Le fragment ER24 complet représente la totalité de la séquence codante. La construction dite consensus présente une séquence très conservée dans la famille MBF1. Le gène *PDS* (phytoène désaturase) est utilisé comme un témoin car il code une enzyme impliquée dans les voies de biosynthèse des pigments. Ainsi, dans les tissus ou l'expression du gène *PDS* est réprimé, des taches blanches conséquentes à l'absence de pigments (chlorophylle ou carot no ides), sont observées. Quelques semaines après infection les premiers symptômes de l'infection et de la mise en place du mécanisme de PTGS sont apparus sur les plantes témoins et ce, quel que soit la variété ou le type d'agroinfection utilisé (figure III-3). En effet, les plantes présentent des zones dépigmentées, sous forme de taches irrégulières, tant au niveau des feuilles que des tiges et des fruits. Cependant, concernant les MBF1, sur l'ensemble des plantes obtenues après infection avec une ou plusieurs constructions combinées, aucun phénotype n'a pu être clairement observé.

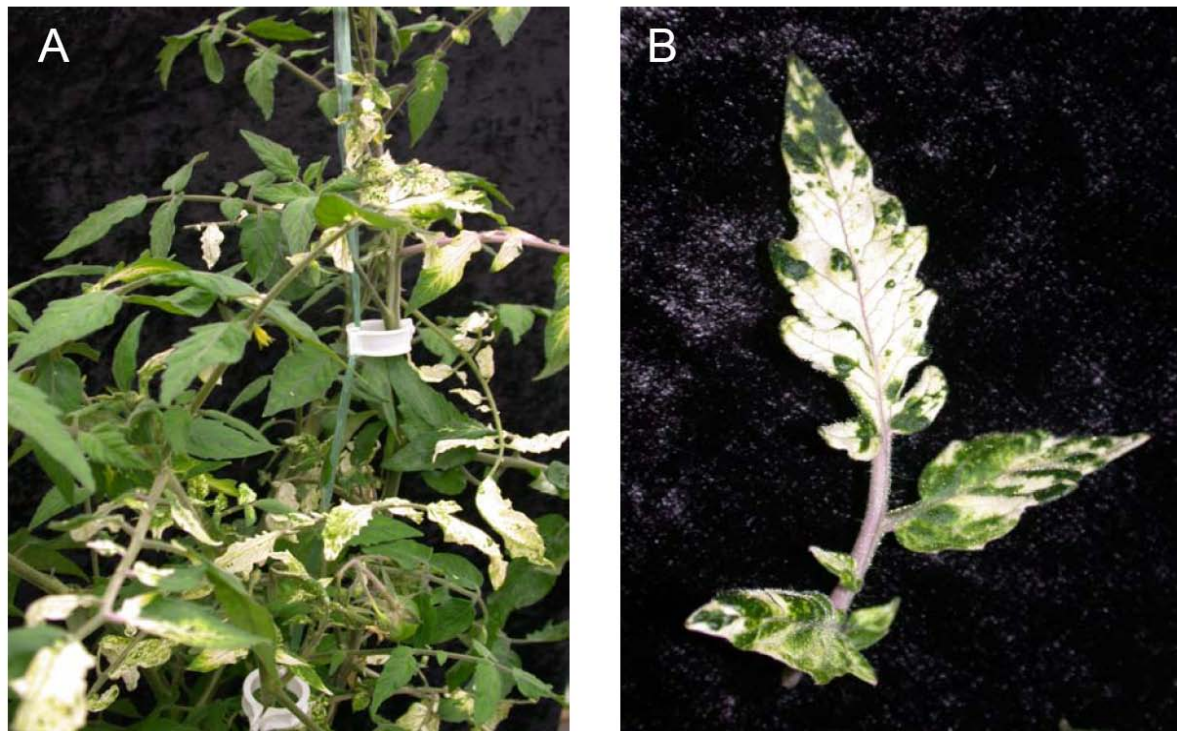
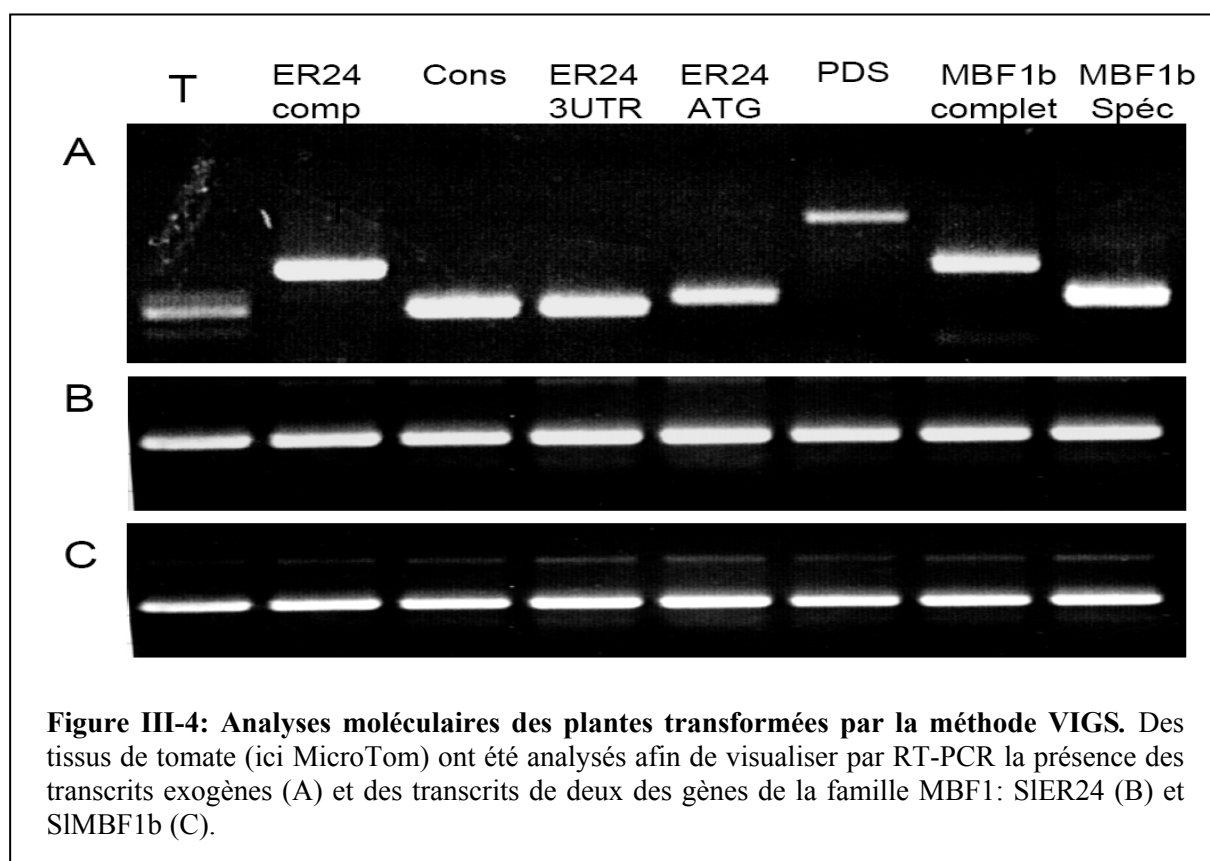


Figure III-3: Phénotypes observés sur les plants de tomate témoins transformés par la technique VIGS. Les plants de tomate *Ailsa Craig* (A) et *MicroTom* (B) ont été infectés par des agrobactéries portant le vecteur VIGS contenant la séquence du gène codant pour la phytoène désaturase, enzyme impliquée dans la synthèse des pigments. Les tissus dépigmentés correspondent aux zones où le gène PDS subit un *silencing* par des mécanismes de PTGS.

Les analyses moléculaires de ces plantes montrent que la sur-expression du transgène est effective dans la plupart des tissus testés mais que les transcrits endogènes correspondants ne subissent pas de dégradation spécifique par le mécanisme de PTGS (figure III-4). La stratégie VIGS n'a pas permis d'obtenir des plants de tomates altérées dans l'expression d'un ou plusieurs MBF1.



5-Conclusion

Le travail présenté dans ce chapitre apporte des données nouvelles sur les médiateurs transcriptionnels de la réponse à l'éthylène et sur leur rôle dans la régulation de certains processus de développement des plantes.

En premier lieu l'isolement et la description de la famille de gènes codant les MBF1 chez les plantes permet d'identifier de nouvelles cibles pour l'étude de la régulation transcriptionnelle en relation avec les signaux soit endogènes (hormones) soit d'origine environnementale (température, stress oxydatif). Parce qu'elles offrent la possibilité de se lier à plusieurs types de facteurs de transcription, les protéines MBF1 se présentent comme des candidats forts pour être les lieux d'intégration de plusieurs voies de signalisation. Il est montré que les gènes MBF1 possèdent des profils d'expression distinctifs ce qui suggère leur implication différenciée dans des situations physiologiques différentes. En particulier le gène *SIER24* présente une expression fortement associée au déroulement de la maturation du fruit et à la réponse aux stress thermiques.

Par le passé, différentes tentatives visant à altérer l'expression des gènes MBF1 chez la tomate se sont révélées inefficaces. La stratégie VIGS présentée dans ce chapitre n'a pas conduit à l'obtention de plants de tomate partiellement ou transitoirement altérés dans l'expression d'un MBF1. En revanche, il est démontré qu'une fusion de *SIER24* à un motif EAR est capable, dans un système cellulaire, de réduire l'expression de la protéine GFP dirigée par un promoteur synthétique de réponse à l'éthylène riche en « boîtes » GCC. Par ailleurs, la génération de plantes transgéniques comportant une fusion de *AtMBF1c* d'*Arabidopsis* au motif EAR dirigée par le promoteur 35S a permis d'observer une réduction du pourcentage de germination et des phénomènes de nanisme de la plante. Une fusion similaire avec le gène *SIER24* de tomate introduite chez le cultivar MicroTom induit un retard de germination mais pas d'effet notable sur le développement de la plante. La germination est un processus complexe régulé par différentes hormones dont principalement la GA, l'ABA mais aussi l'éthylène et les brassinostéroïdes (Kucera *et al.*, 2005). L'éthylène est notamment impliqué dans les phénomènes de dégradation de l'enveloppe de la graine, permettant l'émergence de la radicule. D'ailleurs, certains mutants insensibles à l'éthylène présentent une dormance accrue (Ghassemian *et al.*, 2000). MBF1c pourrait, dans ce cas, intervenir comme co-facteur dans la régulation de gènes impliqués dans le processus de germination et en

réponse à l'éthylène. Le second phénotype observé chez *Arabidopsis* implique une altération des processus de division et/ou d'expansion cellulaire. Plusieurs hormones sont régulatrices de ces événements dont les gibbérellines, les cytokinines, l'auxine et plus particulièrement les brassinostéroïdes. L'absence de phénotypes chez MicroTom, une variété naine de tomate affectée dans la synthèse des brassinostéroïdes, suggère que ceux observés chez *Arabidopsis* pourraient résulter d'une altération dans la signalisation liée à cette hormone. Ces résultats mettent à jour de nouvelles fonctions pour ces co-activateurs en plus de ceux décrits précédemment. Ainsi, les co-activateurs de la transcription de type MBF1 pourraient être impliqués au sens large dans la signalisation croisée entre plusieurs voies de régulations hormonales.

Au total, les données nouvelles acquises au cours de ce travail et les lignées transgéniques générées apportent des ressources biologiques intéressantes qui permettront d'explorer le mode d'action de l'éthylène au cours de processus de développement variés des plantes en relation avec d'autres hormones.

Conclusion générale et Perspectives des travaux de thèse

Les résultats présentés dans ce manuscrit apportent de nouvelles informations concernant la régulation transcriptionnelle de l'expression génique chez la tomate et ceci *via* l'étude de régions promotrices de gènes supposés s'exprimer spécifiquement dans le fruit et *via* la caractérisation d'un co-facteur de transcription de type MBF1 répondant à l'éthylène.

En premier lieu, les régions promotrices de deux gènes, *SlEXP1* codant une expansine et *SlAAT* codant une alcool acyl-transférase ont été analysées. Un motif consensus de 21 pb, identifié à partir de plusieurs promoteurs fruits-spécifiques chez la tomate, a été étudié. Toutefois nous n'avons pas pu montrer d'une part que cet élément soit capable d'interagir *in vitro* avec des facteurs nucléaires et d'autre part, par une approche utilisant la transformation stable, qu'il soit capable de diriger l'expression d'un gène rapporteur GUS spécifiquement dans le fruit. A ce jour, seul un motif conférant la spécificité fruit a été décrit chez le melon au cours de la caractérisation du promoteur d'un gène codant la cucumisine (Yamagata *et al.*, 2002). Cependant, cet élément n'est pas présent dans les régions promotrices des différents gènes fruit-spécifiques de tomate analysés. Une perspective de ce travail serait de tester si ce motif identifié à partir d'un promoteur de melon pourrait également diriger l'expression d'un transgène spécifiquement dans le fruit, chez la tomate. En ce qui concerne le profil d'expression quasi constitutif du promoteur du gène *AAT*, il pourrait s'expliquer par l'absence d'éléments répresseurs. Il conviendrait donc d'isoler des séquences plus en amont des régions analysées. Les profils d'expression obtenus avec le promoteur de l'expansine fusionné au gène rapporteur *gus* indiquent que des éléments régulateurs pourraient, dans ce cas, être manquants. Ce qui nécessiterait également d'isoler et d'analyser de plus grands fragments de promoteurs. Cependant, on ne peut pas exclure que des éléments régulateurs soient situés en dehors de ces régions promotrices, par exemple dans des séquences introniques.

Une autre perspective pour ce travail consisterait à s'appuyer sur les données de séquences produites par le consortium international de séquençage du génome de la tomate. En effet, à l'heure actuelle, près de 25 % du génome a été décrypté. Une exploitation de ces données de séquençage génomique couplée à des analyses *in silico* des données de transcriptomique pourraient être mise en place afin d'identifier de nouvelles séquences promotrices à partir de gènes connus pour être régulés préférentiellement ou spécifiquement dans le fruit. Des approches utilisant les modèles de Markov cachés (Hidden Markov Model) sont couramment utilisées pour extraire et classer des motifs nucléotidiques présents dans des régions promotrices de génomes séquencés. L'analyse, consiste soit à utiliser l'ensemble des séquences intergéniques disponibles, soit à travailler à priori sur un jeu de séquences

promotrices de gènes sélectionnés en fonction de leur profils d'expression. La validation biologique permettrait ensuite de définir les gènes co-régulés.

En second lieu, l'isolement et la description de la famille de gène codant pour les MBF1 chez les plantes nous permet d'identifier de nouvelles cibles pour l'étude de la régulation transcriptionnelle en relation avec les signaux endogènes ou d'origine environnementale. Parce qu'elles ont la possibilité de se lier à plusieurs types de facteurs de transcription, les protéines MBF1 se présentent comme des candidats forts pour constituer un lieu privilégié d'intégration de plusieurs voies de signalisation. Les études menées avec la technique du double hybride par Jaimes-Miranda *et al.*, (2007) ont révélé plusieurs protéines candidates pour une interaction avec *SIER24*. Afin de s'assurer qu'il s'agit bien d'interactions spécifiques, il conviendrait d'utiliser d'autres méthodes d'analyses. C'est pour cela qu'au cours de la thèse nous avons mis en place et débuter le développement d'un nouvel outil destiné à l'identification de partenaires protéiques, il s'agit de la technologie Tap-Tag (Puig *et al.*, 2001). Des lignées transgéniques de tomate et d'*Arabidopsis* ont été générées, mais nous n'avons malheureusement pas pu aller jusqu'au bout du développement de la technique, cependant, les outils mis en place devraient permettre de poursuivre aisément ce travail.

Une analyse phylogénétique des MBF1 chez la tomate et des études d'expression réalisées en collaboration (Sanchez-Bellesta *et al.*, 2006) suggère que *SIER24* pourrait jouer un rôle spécifique dans la réponse à l'éthylène et aux stress abiotiques et, dans la maturation des fruits. Pour vérifier le rôle fonctionnel de ce gène, des transformations stables avec des constructions sens et antisens afin de sous- ou de sur-exprimer le gène ont été réalisées au laboratoire. De même, nous avons mis en œuvre une méthodologie de « silencing » transitoire sur plante entière, le VIGS (*Virus-Induced Gene Silencing*). Cependant, aucun phénotype n'a pu être relevé d'après les observations et les analyses des plantes transgéniques ou des plantes transfectées obtenues. Ce constat pourrait résulter de la redondance fonctionnelle de certains membres de la famille de MBF1. Nous avons donc utilisé une approche alternative basée sur la production de protéines chimériques par fusion de gènes MBF1 avec le domaine répresseur EAR isolé à partir de facteurs de transcription de type ERF chez *Arabidopsis* (Hiratsu *et al.*, 2003). Cette stratégie s'est avérée efficace puisque les plantes transgéniques obtenues ont présenté un phénotype au niveau du processus de germination et de croissance des plantes. Il s'agit en fait de la première démonstration de l'efficacité de cette technique pour un facteur de transcription ne se liant pas directement à l'ADN. De plus, nous avons montré que dans ces plantes l'expression des autres MBF1 n'est pas altérée. Cependant, des travaux

complémentaires sont nécessaires pour caractériser plus finement les plantes transgéniques obtenues, en particulier, il serait intéressant de rechercher des effets éventuels sur la maturation du fruit. Enfin, l'utilisation des outils de la transcriptomique à haut débit tels que les *microarrays* est envisageable pour mieux comprendre les effets phénotypiques de l'inactivation de *SIER24* dans les différentes parties de la plante.

Au final, cette thèse ouvre de nombreuses perspectives pour l'étude du rôle de l'éthylène et des interactions hormonales dans la régulation l'expression génique et ce, à travers une meilleure compréhension de l'activité des complexes transcriptionnels dans lesquels est impliquée la protéine *SIER24*. Sur le plan méthodologique, cette thèse a démontré les limites de certaines approches d'identification fonctionnelle de gènes, mais elle a permis de construire un outil unique pour l'étude de ce type de co-facteur de transcription consistant en des plantes transgéniques affectées dans la fonction de *SIER24*. A l'issu de ce travail, il devient maintenant possible de caractériser le phénotype de ces lignées générées et donc de préciser avec plus de détails la fonction de *SIER24* sur les plans physiologiques, biochimiques et moléculaires dans divers organes de la plante et plus particulièrement dans le fruit.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abel S**, Theologis A. (1994). Transient transformation of *Arabidopsis* leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression, *Plant J.* 5: 421–7.
- Abeles FB**, Morgan PW, Saltveit ME. (1992) Ethylene in plant biology. San Diego: Academic. 2nd ed.
- Adams DO** and Yang SF. (1979) Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 170–4.
- Adams-Phillips L**, Barry C, Giovannoni JJ. (2004) Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends Plant Sci.*, 9 (7): 331-8.
- Aharoni A**, Keizer LC, Bouwmeester HJ, Sun Z, Alvarez-Huerta M, Verhoeven HA, Blaas J, van Houwelingen AM, De Vos RC, van der Voet H, Jansen RC, Guis M, Mol J, Davis RW, Schena M, van Tunen AJ, O'Connell AP. (2000) Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell.*, 12 (5): 613-6.
- Alba R**, Cordonnier-Pratt MM, Pratt LH. (2000) Localized phytochromes regulate lycopene accumulation independently of ethylene production in tomato. *Plant Physiol.*, 123 (1): 363-70.
- Alba R**, Fei Z, Payton P, Liu Y, Moore SL, Debbie P, Cohn J, D'Ascenzo M, Gordon JS, Rose JK, Martin G, Tanksley SD, Bouzayen M, Jahn MM, Giovannoni J. (2004) cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. *Plant J.*, 39 (5): 697-714.
- Alba R**, Payton P, Fei Z, McQuinn R, Debbie P, Martin GB, Tanksley SD, Giovannoni JJ. (2005) Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *Plant Cell*, 17: 2954-65.
- Aravind L** and Koonin EV. (1999) DNA-binding proteins and evolution of transcriptionregulation in the archaea. *Nucleic Acids Res.*, 27: 4658-70.
- Arce DP**, Tonon C, Zanetti ME, Godoy AV, Hirose S, Casalongue CA. (2006) The potato transcriptional co-activator StMBF1 is up-regulated in response to oxidative stress and interacts with the TATA-box binding protein. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 39 (4): 355-60.
- Arumuganathan K**, Martin GB, Telenius H, Tanksley SD, Earle ED. (1994) Chromosome 2-specific DNA clones from flow-sorted chromosomes of tomato. *Mol. Gen. Genet.*, 242 (5): 551-8
- Atkinson CF**, Sager JC, Alazraki M, Loader C. (1998) Composting in advanced life support systems. *Acta Hort.*, 469: 195-201.

Ayub R, Guis M, Ben Amor M, Gillot L, Roustan JP, Latché A, Bouzayen M, Pech JC. (1996) Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nat. Biotechnol.*, 14 (7): 828-9.

Bachem CW, Van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M., Visser RG. (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J.*, 9: 745-53.

Barry CS, Llop-Tous MI, Grierson D. (2000) The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiol.*, 123: 979-86.

Barry CS, McQuinn RP, Thompson AJ, Seymour GB, Grierson D, Giovannoni JJ. (2005) Ethylene insensitivity conferred by the Green-ripe and Never-ripe 2 ripening mutants of tomato. *Plant Physiol.* 138 (1):267-75.

Barry CS, Giovannoni JJ. (2006) Ripening in the tomato Green-ripe mutant is inhibited by ectopic expression of a protein that disrupts ethylene signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103 (20): 7923-8.

Baulcombe. (2004) RNA silencing in plants. *Nature*, 431 (7006): 356-63.

Beekwilder J, Alvarez-Huerta M, Neef E, Verstappen FW, Bouwmeester HJ, Aharoni A. (2004) Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiol.*, 135 (4): 1865-78.

Biale JB. (1964) Growth, Maturation, and Senescence in Fruits: Recent knowledge on growth regulation and on biological oxidations has been applied to studies with fruits. *Science*, 146 (3646): 880-8.

Bird CR, Smith CJ, Ray JA, Moureau P, Bevan BW, Bird AS, Hughes S, Morris PC, Grierson D and SchuchW. (1988) The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expression in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.*, 11: 651-62.

Blume B, Barry CS, Hamilton AJ, Bouzayen M, Grierson D. (1997) Identification of transposon-like elements in non-coding regions of tomato ACC oxidase genes. *Mol Gen Genet.*, 254 (3): 297-303.

Blume B, Grierson D. (1997) Expression of ACC oxidase promoter-GUS fusions in tomato and *Nicotiana plumbaginifolia* regulated by developmental and environmental stimuli. *Plant J.*, 12 (4): 731-46.

Bouzayen M, Latché A, Pech JC, Marigo G. (1989) Carrier-Mediated Uptake of 1-(Malonylamino)cyclopropane-1-Carboxylic Acid in Vacuoles Isolated from *Catharanthus roseus* Cells. *Plant Physiol.*, 91 (4): 1317-22.

Brendel C, Gelman L, Auwerx J. (2002) Multiprotein bridging factor-1 (MBF-1) is a cofactor for nuclear receptors that regulate lipid metabolism. *Mol. Endocrinol.*, 16: 1367-77.

- Brigneti** G, Martín-Hernández AM, Jin H, Chen J, Baulcombe DC, Baker B, Jones JD. (2004) Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *Plant J.*, 39 (2): 264-72.
- Brivanlou** AH and Darnell JE. (2002) Signal transduction and the control of gene expression. *Science*, 295: 813-8.
- Brummell** DA, Harpster MH. (2001) Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.*, 47 (1-2): 311-40.
- Brummell** DA, Harpster MH, Civello PM, Palys JM, Bennett AB et Dunsmuir P. (1999). Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell*, 11: 2203-16.
- Bucheli** P, Voirol E, De La Torre R, Lopez J, Rytz A. (1999) Definition of volatile markers for flavor of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as tool in selection and breeding. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 659-64.
- Bulger** M, Groudine M. (1999) Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev.*, 13 (19): 2465-77.
- Burley** SK and Roeder RG. (1996) Biochemistry and structural biology of transcriptionfactor IID (TFIID). *Annu. Rev. Biochem.*, 65: 769-99.
- Busk** PK, Wulf-Andersen L, Strom CC, Enevoldsen M, Thirstrup K, Haunso S, Sheikh SP. (2003) Multiprotein bridging factor 1 cooperates with c-Jun and is necessary for cardiac hypertrophy in vitro. *Exp. Cell. Res.*, 286: 102-14.
- Castiglione** S, Pirola B, Sala F, Ventura M, Pancaldi M, Sansavini S. (1998) Molecular studies of ACC synthase and ACC oxidase genes in apple. *Acta Hort.*, 484: 305-10.
- Causse** M, Duffe P, Gomez MC, Buret M, Damidaux R, Zamir D, Gur A, Chevalier C, Lemaire-Chamley M, Rothan C. (2004) A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. *Exp Bot.*, 55 (403): 1671-85.
- Chang** C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM. (1993). Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science*, 262 (5133): 539-44.
- Chen** JC, Jiang CZ, Gookin TE, Hunter DA, Clark DG, Reid MS. (2004) Chalcone synthase as a reporter in virus-induced gene silencing studies of flower senescence. *Plant Mol. Biol.*, 55 (4): 521-30.
- Chengappa** S, Guilleroux M, Phillips W, Shields R. (1999) Transgenic tomato plants with decreased sucrose synthase are unaltered in starch and sugar accumulation in the fruit. *Plant Mol. Biol.*, 40 (2): 213-21.
- Chung** E, Park JM, Oh SK, Joung YH, Lee S, Choi D. (2004) Molecular and biochemical characterization of the *Capsicum annuum* calcium-dependent protein kinase 3 (CaCDPK3) gene induced by abiotic and biotic stresses. *Planta.*, 220 (2): 286-95.

- Colbert T**, Till BJ, Tompa R, Reynolds S, Steine MN, Yeung AT, McCallum CM, Comai L, Henikoff S (2001). High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol* 126: 480-4.
- D'Auria JC**, Chen F, Pichersky E. (2002) Characterization of an acyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damaged leaves of *Clarkia breweri* Plant Physiol., 130 (1): 466-76.
- Deikman J**, Kline R, Fischer RL. (1992) Organization of Ripening and Ethylene Regulatory Regions in a Fruit-Specific Promoter from Tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Physiol., 100 (4): 2013-7.
- Deikman J**, Xu RL, Kneissl ML, Ciardi JA, Kim KN, Pelah D. (1998) Separation of cis elements responsive to ethylene, fruit development and ripening in the 5'-flanking region of ripening-related E8 gene. Plant Mol. Biol., 37: 1001-11.
- Delalande C**, Regad F, Zouine M, Frasse P, Latche A, Pech JC, Bouzayen M. (2007) The French contribution to the multinational Solanaceae Genomics Project as integrated part of the European effort. Plant Biotech., 24: 27-31.
- Diatchenko L**, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 93 (12): 6025-30.
- Dikstein R**, Zhou S, Tjian R. (1996) Human TAFII 105 is a cell type-specific TFIID subunit related to hTAFII130. Cell, 87: 137-46.
- Doganlar S**, Frary A, Ku HM, Tanksley SD. (2002) Mapping quantitative trait loci in inbred backcross lines of *Lycopersicon pimpinellifolium* (LA1589). Genome, 45 (6): 1189-202.
- Dotto MC**, Martínez GA, Civello PM. (2006) Expression of expansin genes in strawberry varieties with contrasting fruit firmness. Plant Physiol. Biochem., 44 (5-6): 301-7.
- Doyle JJ et Doyle JL**. (1992) . Isolation of plant DNA from fresh tissu. Focus 12: 13-5.
- Dragoni I**, Mariotti M, Consalez GG, Soria MR, Maier JA. (1998) EDF-1, a novel gene product down-regulated in human endothelial cell differentiation. J. Biol. Chem., 273: 31119-24.
- Dudareva N**, D'Auria JC, Nam KH, Raguso RA, Pichersky E. (1998) Acetyl-CoA:benzylalcohol acetyltransferase an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. Plant J., 14 (3): 297-304.
- Elliott KJ**, Butler WO, Dickinson CD, Konno Y, Vedvick TS, Fitzmaurice L, Mirkov TE. (1993) Isolation and characterization of fruit vacuolar invertase genes from two tomato species and temporal differences in mRNA levels during fruit ripening. Plant Mol. Biol., 21(3): 515-24.

- El-Sharkawy** I, Manríquez D, Flores FB, Regad F, Bouzayen M, Latché A, Pech JC. (2005) Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. *Plant Mol. Biol.*, 59(2): 345-62.
- Emmanuel** E, Levy AA. (2002) Tomato mutants as tools for functional genomics. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 5(2): 112-7.
- Eshed** Y, Zamir D. (1995) An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics.*, 141(3): 1147-62.
- Fainsod** A, Bogarad LD, Ruusala T, Lubin M, Crothers DM, Ruddle FH. (1986) The homeo domain of a murine protein binds 5' to its own homeo box. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83: 9532-6.
- Faivre-Rampant** O, Gilroy EM, Hrubikova K, Hein I, Millam S, Loake GJ, Birch P, Taylor M, Lacomme C. (2004) Potato virus X-induced gene silencing in leaves and tubers of potato. *Plant Physiol.*, 134 (4): 1308-16.
- Fei**, Z, Tang X, Alba R, Giovannoni J. (2006). Tomato Expression Database (TED): A Suite of Data Presentation and Analysis Tools. *Nucleic Acids Research*, 34: D766-D770.
- Felsenfeld** G, Boyes J, Chung J, Clark D, Studitsky V. (1996) Chromatin structure and gene expression. *Proc Nat. Acad. Sci. U S A.*, 93 (18): 9384-8.
- Flores** F, El Yahyaoui F, de Billerbeck G, Romojaro F, Latché A, Bouzayen M, Pech JC, Ambid C. (2002) Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons. *J. Exp. Bot.*, 53 (367): 201-6.
- Francastel** C, Magis W, Groudine M. (2001) Nuclear relocation of a transactivator subunit precedes target gene activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 98 (21): 12120-5.
- Fraser** PD, Romer S, Shipton CA, Mills PB, Kiano JW, Misawa N, Drake RG, Schuch W, Bramley PM. (2002) Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 99 (2): 1092-7.
- Fu** DQ, Zhu BZ, Zhu HL. (2005) Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *Plant. J.*, 43 (2): 299-308.
- Fulton** TM, Van der Hoeven R, Eannetta NT, Tanksley SD. (2002) Identification, analysis, and utilization of conserved ortholog set markers for comparative genomics in higher plants. *Plant Cell*, 14 (7): 1457-67.
- Gazzarrini** S and McCourt P. (2003) Cross-talk in plant hormone signalling: what Arabidopsis mutants are telling us. *Ann. Bot.*, 91 (6): 605-12.
- Ghassemian** M, Nambara E, Cutler S, Kawaide H, Kamiya Y, McCourt P. (2000) Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in Arabidopsis. *Plant Cell*, 12: 1117-26.

- Gilmartin** PM, Sarokin L, Memelink J, Chua NH. (1990) Molecular light switches for plant genes. *Plant Cell*, 2 (5): 369-78.
- Giovannoni** J. (2001) Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52: 725-49.
- Godoy** AV, Zanetti ME, San Segundo B, Casalongue CA. (2001) Identification of a putative *Solanum tuberosum* transcriptional coactivator up-regulated in potato tubers by *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* infection and wounding. *Physiol Plant*, 112: 217-22.
- Gonzalez-Bosch** C, Brummell DA, Bennett AB. (1996) Differential Expression of Two Endo-1,4-[beta]-Glucanase Genes in Pericarp and Locules of Wild-Type and Mutant Tomato Fruit. *Plant Physiol.*, 111 (4): 1313-9.
- Good** X, Kellogg JA, Wagoner W, Langhoff D, Matsumura W, Bestwick RK. (1994) Reduced ethylene synthesis by transgenic tomatoes expressing S-adenosylmethionine hydrolase. *Plant Mol. Biol.*, 26(3): 781-90.
- Goodrich** JA and Tjian R. (1994) TBP-TAF complexes: selectivity factors for eukaryotic transcription. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 7: 344-55.
- Gray** J, Picton S, Shabbeer J, Schuch W, Grierson D. (1992) Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes. *Plant Mol. Biol.*, 19 (1): 69-87.
- Griffiths** A, Barry C, Alpuche-Soli AG, Grierson D. (1999) Ethylene and developmental signals regulate expression of lipoxygenase genes during tomato fruit ripening. *J. Exp. Bot.*, 50: 793-8.
- Griffiths** and Anthony J F. (2001) Modern genetic analysis: integrating genes and genomes. 2nd ed. New York : W.H. Freeman and Co.
- Grandillo** S, Ku HM, Tanksley SD. (1999) Identifying the loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. *Theoretical and Applied Genetic*, 99 (6): 978-87.
- Guis** M, Botondi R, Ben Amor M, Ayub R, Bouzayen M, Pech JC, Latché A. (1997) Ripening-associated biochemical traits of cantaloupe Charentais melons expressing an antisense ACC oxidase transgene. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 122: 748-51.
- Guzmán** P, Ecker JR. (1990) Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell*, 2 (6): 513-23.
- Haanstra** J. P. W., Wye C., Verbakel H., Meijer-Dekens F., van den Berg P., Odinet P., W. van Heusden A., Tanksley S., Lindhout P., Peleman J. (1999) An integrated high-density RFLP-AFLP map of tomato based on two *Lycopersicon esculentum* × *L. pennellii* F2 populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 254-71.
- Haanstra** JP, Laugé R, Meijer-Dekens F, Bonnema G, de Wit PJ, Lindhout P. (1999) The Cf-ECP2 gene is linked to, but not part of, the Cf-4/Cf-9 cluster on the short arm of chromosome 1 in tomato. *Mol. Gen. Genet.*, 262 (4-5): 839-45.

- Hamilton** AJ, Lycett GW, Grierson D. (1990) Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature*, 346: 284-7.
- Harriman** RW, Tieman DM, Handa AK. (1991) Molecular Cloning of Tomato Pectin Methylesterase Gene and its Expression in Rutgers, Ripening Inhibitor, Nonripening, and Never Ripe Tomato Fruits. *Plant Physiol.*, 97 (1): 80-7.
- Haubrick** LL and Assmann SM. (2006) Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles. *Plant Cell Environ.*, 29 (3): 446-57.
- Hayama** H, Shimada T, Fujii H, Ito A, Kashimura Y. (2006) Ethylene-regulation of fruit softening and softening-related genes in peach. *J. Exp. Bot.*, 57 (15): 4071-7.
- He** ZM, Jiang XL, Qi Y, Luo DQ. (2007) Assessment of the utility of the tomato fruit-specific E8 promoter for driving vaccine antigen expression. *Genetica*, sous presse.
- Hieter**, P. and Boguski, M. (1997). Functional genomics: it's all how you read it. *Science*, 278 : 601-2.
- Higo** K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T. (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Res.*, 27 (1): 297-300.
- Hiratsu** K, Matsui K, Koyama T, Ohme-takagi M. (2003) Dominant repression of target genes by chimeric repressors that includes the EAR motif, a repression domain, in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 34: 733-9.
- Hoebericht** FA. (2002) Suicidal tomato cells: programmed cell death in suspension-cultured tomato cells and ripening fruit. Thèse de l'« Agotechnological research Institute », Wageningen, Hollande.
- Itzhaki** H, Maxson JM, Woodson WR. (1994) An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione-S-transferase (GST1) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91: 8925-9.
- Jacob-Wilk** D, Holland D, Goldschmidt EE, Riov J, Eyal Y. (1999) Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the Chlase1 gene from ethylene-treated Citrus fruit and its regulation during development. *Plant J.*, 20 (6): 653-61.
- Jaillon** O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, Legeai F, Hugueney P, Dasilva C, Horner D, Mica E, Jublot D, Poulain J, Bruyère C, Billault A, Segurens B, Gouyvenoux M, Ugarte E, Cattonaro F, Anthouard V, Vico V, Del Fabbro C, Alaux M, Di Gaspero G, Dumas V, Felice N, Paillard S, Juman I, Moroldo M, Scalabrin S, Canaguier A, Le Clainche I, Malacrida G, Durand E, Pesole G, Laucou V, Chatelet P, Merdinoglu D, Delledonne M, Pezzotti M, Lecharny A, Scarpelli C, Artiguenave F, Pè ME, Valle G, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon AF, Weissenbach J, Quétier F, Wincker P. (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449 (7161): 463-7.

- Jaimes Miranda F.** (2006) La régulation transcriptionnelle dépendante de l'éthylène. Caractérisation fonctionnelle d'un cofacteur transcriptionnel du type MBF1 et d'un facteur de transcription de la famille des ERF chez la tomate. Thèse Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Jani D, Meena LS, Rizwan-ul-Haq QM, Singh Y, Sharma AK, Tyagi AK.** (2002) Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants. *Transgenic Res.*, 11 (5): 447-54.
- Jarret RL.** (1984) Ripening behavior of the green ripe tomato mutant. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 109: 712.
- Jefferson RA.** (1987) GUS fusions : Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*, 6 (13): 3901-7.
- Jimenez A, Creissen G, Kular B, Firmin J, Robinson S, Verhoeyen M, Mullineaux P.** (2002) Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta.*, 214: 751-8.
- Jindra M, Gaziova I, Uhlirova M, Okabe M, Hiromi Y, Hirose S.** (2004) Coactivator MBF1 preserves the redox-dependent AP-1 activity during oxidative stress in *Drosophila*. *EMBO J.*, 23: 3538-47.
- Jones B, Frasse P, Olmos E, Zegzouti H, Li ZG, Latché A, Pech JC, Bouzayen.** (2002) Down-regulation of DR12, an auxin-response-factor homolog, in the tomato results in a pleiotropic phenotype including dark green and blotchy ripening fruit. *M. Plant J.*, 32 (4): 603-13.
- Kabe Y, Goto M, Shima D, Imai T, Wada T, Morohashi K, Shirakawa M, Hirose S, Handa H.** (1999) The role of human MBF1 as a transcriptional coactivator. *J. Biol. Chem.*, 274: 34196-202.
- Keller E and Cosgrove DJ.** (1995) Expansin in growing tomato leaves.-*Plant J.*, 8: 795-802.
- Khalil Ahmad Q.** (2003) Isolement et analyse fonctionnelle de deux promoteurs de gènes exprimés dans le fruit chez la tomate. Thèse Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Klee HJ, Hayford MB, Kretzmer KA, Barry GF, Kishore GM.** (1991) Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *Plant Cell.*, 3 (11): 1187-93.
- Kranthi KR.** (2005) Bollworm resistance to Bt cotton in India. *Nat. Biotechnol.*, 23 (12): 1476-7.
- Ku HM, Doganlar S, Chen KY, Tanksley SD.** (1999) The genetic basis of pear-shaped tomato fruit. *Theoretical and Applied Genetics*, 99 (5): 844-50.
- Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G.** (2005) Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination, *Seed Sci. Res.*, 15: 281–307.

Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ. (1994) The never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell*, 6 (4): 521-30.

Lemon B and Tjian R. (2000) Orchestrated response: A symphony of transcription factors for gene control. *Genes and Dev.*, 14: 2551-69.

Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P, Rombauts S. (2002) PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res.*, 30: 325-7.

Li Y, Jones L, McQueen-Mason S. (2003) Expansins and cell growth . *Curr. Op. plant biology*, 6 (6): 603-10.

Li FQ, Ueda H, Hirose S. (1994) Mediators of activation of fushi tarazu gene transcription by BmFTZ-F1. *Mol. Cell Biol.*, 14: 3013-21.

Li ZC, Durachko DM et Cosgrove DJ. (1993). An oat coleoptile wall protein that induces wall extension in vitro and that is antigenically related to a similar protein from cucumber hypocotyls.- *Planta* 191: 349-56.

Liang P et Pardee AB (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257: 967-71.

Lincoln JE and Fischer RL. (1988) Diverse mechanisms for the regulation of ethylene inducible gene expression. *Mol. Gen. Genet.*, 212: 71-5.

Lincoln JE, Coredes S, Read E, Fischer RL. (1987) Regulation of gene expression ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84: 2793-7.

Liu QX, Jindra M, Ueda H, Hiromi Y, Hirose S. (2003) Drosophila MBF1 is a coactivator for Tracheae Defective and contributes to the formation of tracheal and nervous systems. *Development*, 130: 719-28.

Longhurst T, Lee E, Hinde R, Brady C, Speirs J. *Plant Mol Biol.* (1994) Structure of the tomato Adh2 gene and Adh2 pseudogenes, and a study of Adh2 gene expression in fruit., 26 (4): 1073-84.

Lou XM, Yao QH, Zhang Z, Peng RH, Xiong AS, Wang HK. (2007) Expression of the human hepatitis B virus large surface antigen gene in transgenic tomato plants. *Clin. Vaccine Immunol.*, (4): 464-9.

Lucchetta L, Manriquez D, El-Sharkawy I, Flores FB, Sanchez-Bel P, Zouine M, Ginies C, Bouzayen M, Rombaldi C, Pech JC, Latché A. (2007) Biochemical and catalytic properties of three recombinant alcohol acyltransferases of melon. sulfur-containing ester formation, regulatory role of CoA-SH in activity, and sequence elements conferring substrate preference. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (13): 5213-20.

- Manning** K, Tör M, Poole M, Hong Y, Thompson AJ, King GJ, Giovannoni JJ, Seymour GB. (2006) A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat Genet.*, 38 (8): 948-52.
- Manríquez** D, El-Sharkawy I, Flores FB, El-Yahyaoui F, Regad F, Bouzayen M, Latché A, Pech JC. (2006) Two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon exhibit fruit ripening-specific expression and distinct biochemical characteristics. *Plant Mol. Biol.*, 61 (4-5): 675-85.
- Mariotti** M, De Benedictis L, Avon E, Maier JA. (2000) Interaction between endothelial differentiation-related factor-1 and calmodulin in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.*, 275: 24047-51.
- Martelli** MR, Sabina A, Sciancalepore F, Sunseri I et Greco G. (2003) Molecular characterization of ripening fruit processes in strawberry starting from a transcribed genomic DNA fraction. *Acta Hort.*, 625: 113-7.
- Martí** E, Gisbert C, Bishop GJ, Dixon MS, García-Martínez JL. (2006) Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *J. Exp. Bot.*, 57(9): 2037-47.
- Matsui** K, Hiratsu K, Koyama T, Tanaka H, Ohme-takagi M. (2005) A Chimeric AtMYB23 Repressor Induces Hairy Roots, Elongation of Leaves and Stems, and Inhibition of the Deposition of Mucilage on Seed Coats in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.*, 46: 147-55.
- Matsushita** Y, Miyakawa O, Deguchi M, Nishiguchi M, Nyunoya H. (2002) Cloning of a tobacco cDNA coding for a putative transcriptional coactivator MBF1 that interacts with the tomato mosaic virus movement protein. *J. Exp. Bot.*, 53: 1531-2.
- Mayer** C and Grummt I. (2005) Cellular stress and nucleolar function. *Cell Cycle*, 4(8): 1036-8.
- Mayordomo** I and Sanz P. (2002) The *Saccharomyces cerevisiae* 14-3-3 protein Bmh2 is required for regulation of the phosphorylation status of Fin1, a novel intermediate filament protein. *Biochem. J.*, 365: 51-6.
- McQueen-Mason** S and Cosgrove DJ. (1994) Disruption of hydrogen bonding between plant cell polymers by proteins that induce wall extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 6574-8.
- McQueen-Mason** S, Durachko DM et Cosgrove DJ. (1992) Two endogenous proteins that induced cell wall extension in plants. *Plant cell*, 4: 1425-33.
- Meissner** R, Chague V, Zhu Q, Emmanuel E, Elkind Y, Levy AA. (2000) Technical advance: a high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. *Plant J.*, 22 (3): 265-74.
- Mitchell** PJ and Tjian R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*, 245: 371-8.

Mittler R, Merquiol E, Hallak-Herr E, Rachmilevitch S, Kaplan A, Cohen, M. (2001) Living under a "dormant" canopy: a molecular acclimation mechanism of the desert plant *Retama raetam*. *Plant J.* 25, 407-16.

Møller SG and Chua NH. (1999) Interactions and intersections of plant signalling pathways. *J. Mol. Biol.*, 293: 219-34.

Montgomery J, Goldam S, Deikman J, Margossian L, Fischer RL. (1993) Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a fruit ripening gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90: 5939-43.

Mueller LA, Solow TH, Taylor N, Skwarecki B, Buels R, Binns J, Lin C, Wright MH, Ahrens R, Wang Y, Herbst EV, Keyder ER, Menda N, Zamir D., Tanksley SD. (2005) The SOL Genomics Network. A Comparative Resource for Solanaceae Biology and Beyond. *Plant Phys.*, 138: 1310-7.

Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H, Shiomi S, Nakano R, Kubo Y, Inaba. (1998) Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiol.*, 118 (4): 1295-305.

Nicholass FJ, Smith CJ, Schuch W, Bird CR, Grierson D. (1995) High levels of ripening-specific reporter gene expression directed by tomato fruit polygalacturonase gene-flanking regions. *Plant Mol. Biol.*, 28: 423-35

Nishiyama K, Guis M, Rose JK, Kubo Y, Bennett KA, Wangjin L, Kato K, Ushijima K, Nakano R, Inaba A, Bouzayen M, Latche A, Pech JC, Bennett AB. (2007) Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. *J. Exp. Bot.*, 58 (6): 1281-90.

Odell JT, Nagy F, Chua NH. (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature.*, 313 (6005): 810-2.

Oeller PW, Min-Wong L, Taylor LP, Pike DA, Theologis A (1991) Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science*, 254: 436-9.

Ohme-Takagi M and Shinshi H. (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell.*, 7: 173-82.

Ozaki J, Takemaru KI, Ikegami T, Mishima M, Ueda H, Hirose S, Kabe Y, Handa H, Shirakawa M. (1999) Identification of the core domain and the secondary structure of the transcriptional coactivator MBF1. *Genes Cells*, 4: 415-24.

Pear JR, Ridge N, Rasmussen R, Rose RE, Houck CM. (1989) Isolation and characterisation of a fruit specific cDNA and the corresponding genomic clone from tomato. *Plant Mol. Biol.*, 13: 639-51.

Pereira A. (2000) A transgenic perspective on plant functional genomics. *Trans. Res.*, 9 (4-5): 245-60.

Pichersky E, Gang DR. (2000) Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.*, 5 (10): 439-45.

Pih KT, Yi MJ, Liang YS, Shin BJ, Cho MJ, Hwang I, Son D. (2000) Molecular cloning and targeting of a fibrillarin homolog from *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 123 (1): 51-8.

Pnueli L, Hallak-Herr E, Rozenberg M, Cohen M, Goloubinoff P, Kaplan A, Mittler R. (2002) Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *Plant J.*, 31: 319-30.

Powell ALT and Bennett AB. (2002) fruit and vegetable Biotechnology, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge, England. In : V Valpuesta (ED), p 185-21.

Powell, AL, Kalamaki MS, Kurien PA, Gurrieri S, Bennett AB. (2003) Simultaneous transgenic suppression of LePG and LeExp1 influences fruit texture and juice viscosity in a fresh market tomato variety. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 7450-5.

Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M et Séraphin B. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods.*, 24 (3): 218-29

Ramírez YJ, Tasciotti E, Gutierrez-Ortega A, Donayre Torres AJ, Olivera Flores MT, Giacca M, Gómez Lim MA. (2007) Fruit-specific expression of the human immunodeficiency virus type 1 tat gene in tomato plants and its immunogenic potential in mice. *Clin Vaccine Immunol.*, 14 (6): 685-92.

Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC. (2001) Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J.*, 25 (2): 237-45.

Rizhsky L, Liang H, Mittler R. (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol.*, 130: 1143-51.

Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R. (2004) When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol.*, 134: 1683-96.

Roeder RG. (1991) The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem. Sci.*, 16: 402-8.

Rose JK, Lee HH et Bennett AB. (1997). Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94: 5955-60.

Rose JK, Cosgrove DJ, Albersheim P, Darvill AG, Bennett AB. (2000) Detection of expansin proteins and activity during tomato fruit ontogeny. *Plant Physiol.*, 123(4):1583-92.

Schena, M, Shalon, D, Davis, RW, Brown PO. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.*, 270 : 467-70.

- Shalit** M, Katzir N, Tadmor Y, Larkov O, Burger Y, Shalekhet F, Lastochkin E, Ravid U, Amar O, Edelstein M, Karchi Z, Lewinsohn E. (2001) Acetyl-coa: alcohol acetyltransferase activity and aroma formation in ripening melon fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2): 794-9.
- Shaulian** E and Karin M. (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.*, 4: E131-6.
- Sisler** EC, Serek M. (1997) Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiol. Plant.*, 100 (3): 577-82.
- Smith** DL, Starrett DA, Gross KC. (1998) A gene coding for tomato fruit beta-galactosidase II is expressed during fruit ripening. Cloning, characterization, and expression pattern. *Plant Physiol.*, 117 (2): 417-23.
- Souleyre** EJ, Greenwood DR, Friel EN, Karunairetnam S, Newcomb RD. (2005) An alcohol acyl transferase from apple (cv. Royal Gala), MpAAT1, produces esters involved in apple fruit flavor .*FEBS*, 272 (12): 3132-44.
- Speirs** J, Lee E, Holt K, Yong-Duk K, Steele Scott N , Loveys B, Schuch W. (1998) Genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels in ripening tomato fruit affects the balance of some flavor aldehydes and alcohols. *Plant Physiol.*, 117 (3): 1047-58.
- Sugikawa** Y, Ebihara S, Tsuda K, Niwa Y, Yamazaki K. (2005) Transcriptional coactivator MBF1s from Arabidopsis predominantly localize in nucleolus. *J. Plant Res.*, 118 (6): 431-7.
- Sun** HJ, Uchii S, Watanabe S et Ezura HA. (2006) Highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant Cell Physiol.*, 47 (3): 426–31.
- Suzuki** N, Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Mittler R. (2005) Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional coactivator multiprotein bridging factor 1c. *Plant Physiol.*, 139: 1313-22.
- Szabados** L, Charrier B, Kondorosi A, De Bruijn FJ, Ratet P. (1995) New plant promoter and enhancer testing vectors. *Mol. Breed.*, 1: 419-23.
- Takase** T, Yasuhama M, Geekiyanage S, Ogura Y, Kiyosue T. (2007) Overexpression of the chimeric gene of the floral regulator CONSTANS and the EAR motif repressor causes late flowering in Arabidopsis. *Plant Cell Rep.*, 26: 815-21.
- Takemaru** K, Li FQ, Ueda H, Hirose S. (1997) Multiprotein bridging factor 1 (MBF1) is an evolutionarily conserved transcriptional coactivator that connects a regulatory factor and TATA element-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94: 7251-6.
- Takemaru** K, Harashima S, Ueda H, Hirose S. (1998) Yeast coactivator MBF1 mediates GCN4-dependent transcriptional activation. *Mol. Cell Biol.*, 18: 4971-6.
- Tang** Y, Liu DP, Liang CC. (2002) Further understanding of the beta-globin locus regulation at the molecular level: looping or linking models. *Genes Cells.*, 7 (9): 889-900.

Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, de-Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Roder MS, Wing RA, Wu W., Young ND. (1992) High density molecular linkage map of the tomato and potato genome. *Genetics*, 132: 1141-60

Thompson AJ, Tor M, Barry CS, Vrebalov J, Orfila C, Jarvis MC, Giovannoni JJ, Grierson D, Seymour GB. (1999) Molecular and genetic characterization of a novel pleiotropic tomato-ripening mutant. *Plant Physiol.*, 120 (2): 383-90.

Tieman DM, Taylor MG, Ciardi JA, Klee HJ. (2000) The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 97 (10): 5663-8.

Topping J.F. et Lindsey K. (2000) Promoter Trap markers differentiate structural and positional components of polar development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 9: 1713-25.

Tournier B, Sanchez-Ballesta MT, Jones B, Pesquet E, Regad F, Latche A, Pech JC, Bouzayen M. (2003) New members of the tomato ERF family show specific expression pattern and diverse DNA-binding capacity to the GCC box element. *FEBS Lett.*, 550: 149-54.

Tsuda K and Yamazaki K. (2004) Structure and expression analysis of three subtypes of Arabidopsis MBF1 genes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1680: 1-10.

Tsuda K, Tsuji T, Hirose S, Yamazaki K. (2004) Three Arabidopsis MBF1 homologs with distinct expression profiles play roles as transcriptional co-activators. *Plant Cell Physiol.*, 45: 225-31.

Van Haaren MJ and Houck CM. (1993) A functional map of the fruit-specific promoter of the tomato 2A11 gene. *Plant Mol. Biol.*, 21: 625-40.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. (1995) Serial analysis of gene expression. *Science*, 270: 484-7.

Verica JA, Maximova SN, Strem, MD, Carlson JE, Bailey BA, Guiltinan MJ. (2004) Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. *Plant Cell Rep.* 23 (6): 404-13.

Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W, Giovannoni J. (2002) A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor(rin) locus. *Science*, 296 (5566): 343-6.

Wang KL, Li H, Ecker JR. (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell.*, 14 Suppl: S131-51.

Wang H, Jones B, Li Z, Frasse P, Delalande C, Regad F, Chaabouni S, Latché A, Pech JC, Bouzayen M. (2005) The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell.*, 17 (10): 2676-92.

Waterhouse PM, Wang MB, Finnegan EJ. (2001) Role of short RNAs in gene silencing. *Trends Plant Sci.*, 6 (7): 297-301.

Wyllie SG and **Fellman** JK. (2000) Formation of volatile branched chain esters in bananas (*Musa sapientum* L.). *J. Agri. Food Chem.*, 48 (8): 3493-6.

Yahyaoui FE, **Wongs-Aree** C, **Latché** A, **Hackett** R, **Grierson** D, **Pech** JC. (2002) Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyl-transferase involved in the generation of aroma volatile esters during melon ripening. *Eur. J. Biochem.*, 269 (9): 2359-66.

Yamagata H, **Kiyoaki** Y, **Hirata** A, **Aizono** Y. (2002) TGTCACA Motif is a novel cis-regulatory enhancer élément involved in fruit-specific expression of the cucumisin gene. *J. Biol. Chem.*, 277: 11582-90.

Yang SF and **Hoffman** NE. (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 35: 155-89.

Zanetti ME, **Blanco** FA, **Daleo** GR, **Casalongue** CA. (2003) Phosphorylation of a member of the MBF1 transcriptional co-activator family, StMBF1, is stimulated in potato cell suspensions upon fungal elicitor challenge. *J. Exp. Bot.*, 54: 623-32.

Zegzouti H, **Jones** B, **Frasse** P, **Marty** C, **Maitre** B, **Latch** A, **Pech** JC, **Bouzayen** M. (1999) Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display. *Plant J.*, 18: 589-600.